

**Entwicklung und Anwendung molekularer Techniken zur
Charakterisierung von nitrifizierenden und methanotrophen
Populationen in natürlichen Ökosystemen**

Dissertation

zur Erlangung
des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Hans-Peter Horz
aus Kaden (Westerwald)

Marburg/Lahn 2000

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden vom 02.01.1998 bis zum 22.12.2000 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg/Lahn unter der Leitung von PD Dr. Werner Liesack durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter: PD Dr. Werner Liesack

Zweitgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Buckel

Tag der mündlichen Prüfung:

Die in meiner Dissertation beschriebenen Ergebnisse sind in folgenden Originalpublikationen veröffentlicht bzw. zur Veröffentlichung eingereicht:

1. Hans-Peter Horz, Jan-Henrich Rotthauwe, Thomas Lukow und Werner Liesack. 2000. Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of *amoA* PCR products. J. Microbiol. Methods. 39: 197-204.

2. Hans-Peter Horz, Merlin Tchawa Yimga und Werner Liesack (eingereicht). Molecular analysis of methanotrophs associated with roots of submerged rice plants by targeting functional and phylogenetic genes, including *pmoA*-based T-RFLP profiling. Appl. Environ. Microbiol.

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
Abkürzungen	1
I. Zusammenfassung	2
II. Einleitung	4
III. Material und Methoden	13
1 Chemikalien	13
2 Sterilisationsverfahren	13
3 Bakterienkulturen und Umweltproben	13
3.1 Bakterienkulturen	13
3.2 Umweltproben	14
4 Behandlung des Probenmaterials	16
4.1 Vorbehandlung	16
4.2 Nukleinsäure-Extraktion	17
4.2.1 Nukleinsäure-Extraktion aus Reiswurzeln	17
4.2.2 Nukleinsäure-Extraktion aus Wiesenboden	19
4.3 Agarosegelelektrophorese	20
4.4 PCR-Amplifikationen	21
4.4.1 Amplifikation von DNA	21
4.4.2 RT-PCR bakterieller 16S rRNA	23
4.4.3 Aufreinigung von PCR-Produkten	23
5 Molekulare Analysen	24
5.1 T-RFLP-Analysen	24
5.2 DGGE-Analysen	27
5.3 Erstellung von Klonbibliotheken	28
5.3.1 Herstellung von LB-Agarplatten	29
5.3.2 Klonierung	29
5.3.3 Anlegen von Glycerin-Stammkulturen	30
5.4 Sequenzierung	30
5.4.1 Analyse der Klone	30

5.4.2 Sequenzierungsreaktion	31
5.4.3 Analyse der Sequenzierungsprodukte	32
5.5 Phylogenetische Analyse	32
5.5.1 Vorläufige Identifikation	33
5.5.2 Erstellung phylogenetischer Stammbäume	33
5.5.2.1 Erstellung von Protein-Stammbäumen	33
5.5.2.2 Erstellung von 16S rDNA-Stammbäumen	33
IV. Ergebnisse	35
1 Ammoniak-Oxidierer (AAOB)	35
1.1 Ausbau der Sequenzdatenbank und phylogenetische Analyse auf Basis von <i>amoA</i>	35
1.2 T-RFLP-Analyse von <i>amoA</i> -Genen	37
1.3 Relative Abundanz von definierten Gruppen an AAOB in unterschiedlichen Umwelten	40
2 Methanotrophe (MAB) an der Reisswurzel	41
2.1 Etablierung der T-RFLP-Analyse auf Basis von <i>pmoA</i>	42
2.2. Detektion von Umweltsequenzen, Ausbau der <i>pmoA</i> -Datenbank	43
2.3.T-RFLP-Analyse von <i>pmoA</i> -Genen an Reisswurzel	46
2.4 DGGE-Analyse von <i>pmoA</i> -Genen an Reisswurzel	46
2.5 <i>pmoA</i> -T-RFLP-Analyse von verschiedenen Mikrokosmen im Vergleich	46
2.6 Nachweissystem „ <i>mmoX</i> “	48
2.7 Nachweissystem „ <i>mxoF</i> “	49
2.8 Nachweissysteme auf Basis von 16S rDNA („MethT1A“ und „MethT1B“)	49
3. Methanotrophe (MAB) im Wiesenboden	51
3.1 Inkubationsexperiment mit CH ₄	52
3.2 Genetische „Fingerprints“ (T-RFLP, DGGE) auf Basis von „ <i>pmoA</i> “	52
3.3 DGGE von 16S rRNA-Genen („9α“)	55
3.4 DGGE von 16S rRNA-Genen („10γ“)	59

V. Diskussion	61
1 Molekulare Charakterisierung von Ammoniak-Oxidierern	61
1.1 Voraussetzungen für eine <i>amoA</i> -gestützte T-RFLP-Analyse	61
1.2 Phylogenetische Beziehung von AAOB auf Basis von <i>amoA</i> und 16S rDNA	62
1.3 Korrelation von T-RFs zu distinkten Gruppen an AAOB	64
1.4 Relative Amplifikationseffizienz von <i>amoA</i> -Genen	65
1.5 Verbreitung von AAOB in unterschiedlichen Habitaten	65
2 Molekulare Charakterisierung von MAB an Reiswurzeln	66
2.1 Sequenzanalyse von <i>pmoA</i> -Genen	67
2.2 Vergleichende phylogenetische Einordnung von MAB über über 16S rDNA- und <i>pmoA</i> -Gensequenzen	67
2.3 Vergleichende Sequenzanalyse von <i>mxnF</i> -Genen	68
2.4 Vergleichende Sequenzanalyse von <i>mmoX</i> -Genen	69
2.5 T-RFLP-Profil auf Basis von „ <i>pmoA</i> “	69
2.6 Neue <i>pmoA</i> - und <i>mmoX</i> -Entwicklungslinien an Reiswurzeln	70
2.7 Ökologische Bedeutung der Diversität von MAB an Reiswurzeln	72
3. Molekulare Charakterisierung von MAB in Wiesenboden	74
3.1 <i>pmoA</i> -gestützte T-RFLP- und DGGE-Analysen	74
3.2 DGGE-Analysen mit dem 16S rDNA-Nachweissystem „9α“	76
3.3 DGGE-Analysen mit dem 16S rDNA-Nachweissystem „10γ“	77
4. Abschließende Betrachtung des kombinierten molekularen Konzepts zur Charakterisierung von MAB	78
VI. Literaturverzeichnis	80
VII. Anhang	95
<p>Horz, H.-P., J.-H. Rotthauwe, T. Lukow und W. Liesack. 2000. Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of <i>amoA</i> PCR products. J. Microbiol. Methods. 39: 197-204.</p>	
Lebenslauf	
Dank	

Abkürzungen

AAOB	autotrophe Ammoniak-Oxidierer
Bp	Basenpaare
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGGE	denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese
MethT1A/B	PCR-Primersystem spezifisch für 16S rDNA von methanotrophen <i>γ-Proteobacteria</i>
MethT2	PCR-Primersystem spezifisch für 16S rDNA von methanotrophen <i>α-Proteobacteria</i>
MAB	Methan-assimilierende Bakterien (Methanotrophe)
MOB	Methan-oxidierende Bakterien (AAOB und MAB)
PLFA	Phospholipide („phospholipid fatty acids“)
ppmv	Mischungsverhältnis: „parts per million by volume“
sp.	Art („species“)
spp.	Arten
TEMED	N,N,N',N' - Tetramethylethyldiamin
T-RF	terminales Restriktionsfragment
T-RFLP	Terminaler Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus
UpM	Umdrehung pro Minute
9α	PCR-Primersystem spezifisch für 16S rDNA von methanotrophen <i>α-Proteobacteria</i>
10γ	PCR-Primersystem spezifisch für 16S rDNA von methanotrophen <i>γ-Proteobacteria</i>

Weitere Abkürzungen wurden entsprechend der „Information for Authors“ des *European Journal of Biochemistry* verwendet.

I. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden verschiedene molekularbiologische Methoden kombiniert, um das Vorkommen und die Diversität CH_4 -verwertender Organismen (autotrophe Ammoniak-Oxidierer und Methanotrophe) kultivierungsunabhängig in verschiedenen Umwelten zu untersuchen. Dabei sollten genetische "Fingerprinting"-Techniken auf der Basis der funktionellen Gene (*amoA* und *pmoA*), welche für die α -Untereinheiten der Ammoniak-Monooxygenase (AMO) bzw. der partikulären Methan-Monooxygenase (pMMO) kodieren, entwickelt werden. Als zentrale Methode wurde die terminale Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus (T-RFLP)-Analyse angewendet. Das diagnostische Potential der *amoA*- bzw. *pmoA*-gestützten T-RFLP-Analysen für molekular-ökologische Studien wurde durch die Sequenzierung klonierter *amoA*- und *pmoA*-Gene sowie im Vergleich zur *pmoA*-gestützten DGGE evaluiert.

Die *amoA*-gestützte T-RFLP-Analyse wurde zur Sondierung verschiedener Umweltproben (Reis-Mikrokosmen, Süßwasser, marine Gewässer und Klärwerke) angewendet. Durch die Korrelation zwischen Sequenzdaten klonierter *amoA*-Gene und *amoA*-T-RFLP-Profile konnte das Vorkommen distinkter Populationen an Ammoniak-Oxidierern in den jeweiligen Habitaten nachgewiesen werden.

Um zu verifizieren, inwieweit der *pmoA*-basierende Ansatz die Komplexität methanotropher Lebensgemeinschaften in einem definierten Habitat (Reiswurzel, s.u.) widerspiegelt, wurden die gleichen Umweltproben für eine vergleichende Sequenzanalyse der Markergene *mxoF* und *mmoX* herangezogen. *mxoF* kodiert für die α -Untereinheit der Methanol-Dehydrogenase (MDH), und *mmoX* kodiert für die α -Untereinheit der löslichen Methan-Monooxygenase (sMMO). Ergänzend dazu erfolgte die Sequenzanalyse der 16S rRNA-Gene von Typ-I-Methanotrophen (*γ-Proteobacteria*). Die Resultate des „polyphasischen“ molekularen Konzepts favorisierten die *pmoA* als geeigneten Genmarker und bestätigten zugleich die Zuverlässigkeit der *pmoA*-gestützten T-RFLP-Analyse als diagnostisches Instrument, um zwischen phylogenetisch distinkten Gruppen an CH_4 -Verwertern zu differenzieren.

Mit der entwickelten Diagnostik auf Basis von *pmoA* sollten zwei ökologische Fragestellungen adressiert werden:

1. Es sollten die methanotrophen Organismen in Reis-Mikrokosmen, welche einen Großteil des im anoxischen Reisfeldboden gebildeten Methans (CH_4) oxidieren, charakterisiert werden. Dabei fokussierten die Untersuchungen auf das Habitat der Reiswurzel, zu Vergleichszwecken wurde undurchwurzelter Reisfeldboden jedoch in die Analytik miteinbezogen. Die *pmoA*-gestützte T-RFLP-Analyse ermöglichte eine hohe molekulare Auflösung der wurzelassoziierten methanotropher Lebensgemeinschaft. Neben einem persistenten Auftreten von Typ-II-Methanotrophen im Reisfeldboden und an der

Reiswurzel ergaben sich Evidenzen für eine spezifische Anpassung distinkter Populationen von Typ-I-Methanotrophen (der Gattungen *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus* und *Methylomicrobium*) an der Reiswurzel.

2. Es sollten die methanotrophen Populationen, die für die CH₄-Oxidation im Wiesenboden verantwortlich sind, identifiziert werden. Mittels *pmoA*-gestützter T-RFLP-Analyse und DGGE wurden in einer im Winter entnommenen Probe Sequenzen nachgewiesen, die zu bislang uncharakterisierten Methanotrophen korrespondieren. In einer analogen Untersuchung einer Sommerprobe konnten diese Sequenztypen jedoch nicht nachgewiesen werden, so daß man eine starke jahreszeitliche Populationsdynamik von Methanotrophen in diesem Habitat annehmen kann. Der Nachweis bekannter methanotropher Organismen (wie *Methylomicrobium album* und *Methylocystis* spp.) im Wiesenboden war nach Inkubation einer Sommerprobe des Wiesenbodens mit einem definierten CH₄-Mischungsverhältnis mittels *pmoA*- und 16S rDNA-gestützter DGGE möglich.

II. EINLEITUNG

Biogeochemische Bedeutung von Ammoniak- und Methan-oxidierenden Bakterien

Durch die Aktivität von nitrifizierenden und methanotrophen Bakterien in aquatischen und terrestrischen Ökosystemen werden die globalen Kreisläufe der Elemente Stickstoff und Kohlenstoff maßgebend beeinflusst, wodurch es zu komplexen, wechselseitigen Prozessen hinsichtlich des Stoffaustausches zwischen Biosphäre und Atmosphäre kommt. Obwohl es sich physiologisch und phylogenetisch um sehr distinkte Gruppen handelt, haben die chemolithoautotrophen Ammoniak-Oxidierer und die Methanotrophen hinsichtlich ihres Substratspektrums und ihrer Standorte einige Gemeinsamkeiten. So sind beide Organismengruppen im Prinzip befähigt verschiedene chemische Verbindungen, wie NH_4^+ , CH_4 , CO, Methanol, Hydroxylamin, Ethylen, Propylen, Phenol und Trichlorethylen zu oxidieren (Hyman *et al.*, 1984; Bedard *et al.*, 1989; Oldenhuis *et al.*, 1989). Sowohl Nitrifizierer als auch Methanotrophe besiedeln bevorzugt oxisch/anoxische Grenzflächen, in denen es zu einer Überschneidung der durch Mineralisierung in anoxischem Milieu entstandenen Substrate (NH_4^+ und CH_4) und dem für die Energiegewinnung notwendigen Elektronenakzeptor O_2 kommt. Häufig entstehen komplexe, bislang nur wenig verstandene Interaktionen zwischen beiden Organismengruppen (Roy und Knowles, 1995; Neufeld und Knowles, 1999).

Eine besondere Bedeutung kommt beiden Organismen aufgrund ihrer Fähigkeit zu, als eine biologische Senke des CH_4 zu fungieren. Die apparente halbmaximale Substrataffinität ($K_{m(\text{app})}$) ist jedoch bei beiden Organismengruppen unterschiedlich. So liegt sie bei Methanotrophen im mikromolaren Bereich und bei autotrophen Ammoniak-Oxidierern im millimolaren Bereich (Bedard und Knowles, 1989; King und Schnell, 1994; Holmes *et al.*, 1999). CH_4 , das mit 1,7 ppmv (Khalil und Rasmussen, 1994) das häufigste organische Gas in der Atmosphäre ist, absorbiert die Wärmestrahlung der Erdoberfläche ca. 25-fach stärker als CO_2 (Cicerone und Oremland, 1988; Rodhe, 1990; Crutzen, 1991). Somit stellt es neben CO_2 eines der wichtigsten klimarelevanten Treibhausgase dar. Außerdem fördert Methan in der Stratosphäre die Bildung freier Radikale, die den Abbau der Ozonschicht bewirken (Fabian, 1987; Cicerone und Oremland, 1988). Zudem resultiert der Anstieg der Weltbevölkerung in ständigen Erweiterungen bzw. Intensivierungen der Landwirtschaft, insbesondere beim Naßreisanbau, welcher eine Hauptquelle der anthropogen bedingten CH_4 -Emission darstellt. Aufgrund des wachsenden Gefahrenpotentials des CH_4 im Hinblick auf eine drohende Klimakatastrophe sollten Strategien entwickelt werden, die CH_4 -Emission zu reduzieren. Schätzungen zufolge wäre eine Verringerung der CH_4 -Emission 20 bis 60 mal effektiver als äquivalente molare Reduktionen der CO_2 -Emission (Hogan *et al.*, 1991).

CH₄ wird durch methanogene Archaea unter anoxischen Bedingungen am Ende einer komplexen Abbaukette organischer Substanzen gebildet. Wichtige Quellen des biogen produzierten CH₄ sind natürliche Feuchtgebiete, Reisfelder, die Verdauungstrakte von Wiederkäuern, Müll- und Klärschlammdeponien sowie Termiten. Die Netto-Emissionsrate von CH₄ in die Atmosphäre ist also letztendlich das Resultat zweier entgegengesetzter mikrobieller Prozesse, der Methanogenese und der Methanotrophie (Conrad, 1997).

Holmes *et al.*, (1999) faßte die potentiell als biologische CH₄-Senke fungierenden Methanotrophen und autotrophen Ammoniak-Oxidierer unter dem Namen „Methan-oxidierende Bakterien“ (MOB) zusammen. Hinsichtlich der unterschiedlichen Zellphysiologie unterschied er auf der einen Seite die CH₄-assimilierenden Bakterien (= Methanotrophe Bakterien [MAB]) und auf der anderen Seite die CH₄-kooxidierenden Bakterien (= autotrophe Ammoniak-Oxidierer [AAOB]). In Anlehnung an diese Terminologie werden im weiteren Verlauf des Textes die Begriffe MAB und AAOB für die einzelnen Organismengruppen angewandt. Ebenso werden mit der Bezeichnung MOB beide Organismengruppen zusammen angesprochen.

Auch im Hinblick weiterer ökologischer und biotechnologischer Fragestellungen sind Nitrifizierer und Methanotrophe von elementarer Bedeutung. So führt die Umwandlung von NH₄⁺ zu NO₂⁻ bzw. NO₃⁻ in Böden zu einer Auswaschung der Endprodukte, was in einer gesundheitsgefährdenden Belastung von Trinkwasser mit NO₂⁻ bzw. NO₃⁻ resultieren kann. Darüber hinaus werden durch die Aktivität von Nitrifizierern landwirtschaftlich genutzten Böden signifikante Mengen von NH₄⁺-haltigen Verbindungen entzogen (Mac Donald, 1986). Und nicht zuletzt werden während der Nitrifikation u. a. auch die Treibhausgase NO und N₂O gebildet (Tortoso und Hutchinson, 1990; Bock *et al.*, 1994). Als endolithische Bakterien sind Nitrifikanten auch an Verwitterungsprozessen von Natur- und Kunststeinen historischer Bauten beteiligt (Meincke *et al.*, 1989).

Auf der anderen Seite führt die Aktivität von Nitrifizierern zu einem verringerten Eintrag von NH₄-haltigen Verbindungen in Gewässer und somit zu einem geringeren Risiko der Eutrophierung (Hall, 1986). Von besonderer Bedeutung sind auch biotechnische Verfahren, mit denen AAOB in Abwasseraufbereitungsanlagen zur Reinigung von NH₄⁺-haltigem Abwasser durch die Prozesse Nitrifikation/Denitrifikation eingesetzt werden (Painter, 1986). Methanotrophe hingegen werden aufgrund ihres weiten Substratspektrums in biotechnologischen Verfahren eingesetzt, um toxische Industrieprodukte wie aromatische und halogenierte Kohlenwasserstoffe abzubauen (Hanson und Hanson, 1996).

Taxonomie und Physiologie von MOB

AAOB gewinnen ihre Wachstumsenergie durch die Oxidation von NH_4^+ zu NO_2^- , ein Prozeß, der durch die zwei Schlüsselenzyme Ammoniak-Monooxygenase (AMO) und Hydroxylamino-Oxidoreduktase (HAO) über das Intermediat Hydroxylamin (NH_2OH) katalysiert wird. Die weitere Umwandlung von NO_2^- zu NO_3^- erfolgt durch eine andere Gruppe von Mikroorganismen, den Nitrit-oxidierenden Bakterien. Bislang wurden keine AAOB entdeckt, welche zur alleinigen Umwandlung von NH_4^+ bis zu NO_3^- befähigt sind (Bothe *et al.*, 2000). Die Kohlenstoff-Fixierung erfolgt über den Calvin-Benson-Zyklus (Watson *et al.*, 1981). Vergleichende 16S rDNA-Sequenzierung gruppiert die AAOB in zwei monophyletische Gruppen innerhalb der *Proteobacteria*: die Gattung *Nitrosococcus* ist Mitglied der Subklasse der γ -*Proteobacteria*, wohingegen die beiden Gattungen *Nitrosospira* und *Nitrosomonas* zur Subklasse der β -*Proteobacteria* gehören. Interessanterweise erscheint die AMO von *Nitrosococcus* spp. auf Basis von Sequenzvergleichen der pMMO der MAB näher verwandt zu sein, als zu der AMO der *Nitrosospira/Nitrosomonas*-Gruppe.

MAB sind als eine Untergruppe der physiologisch distinkten Gruppe der Methyloprophen durch die spezielle Fähigkeit charakterisiert CH_4 als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen. Grundlegende physiologische und morphologische Unterschiede innerhalb der Gruppe der MAB wie die Art der Kohlenstoff-Fixierung, die Anordnung der intracytoplasmatischen Membranen und der G + C-Gehalt führten zu einer Einteilung in Typ-I- und Typ-II-MAB (Whittenbury *et al.*, 1970; Galchenko und Andreev, 1984). Da *Methylococcus* spp. Charakteristika beider MAB-Gruppen besitzen, wurden sie zunächst als Typ-X klassifiziert, später jedoch aufgrund der phylogenetischen Verwandtschaft den Typ-I-MAB zugerechnet (Bowman *et al.*, 1993). Die phylogenetischen Analysen auf Basis der 16S rDNA und 5S rDNA zeigten, daß die Typ-II-MAB eine distinkte Gruppe innerhalb der α -*Proteobacteria* formen, wohingegen die Typ-I-MAB innerhalb der γ -*Proteobacteria* gruppieren (Bratina *et al.*, 1992; Bowman *et al.*, 1993). Aufgrund physiologischer, morphologischer und phylogenetischer Unterschiede lassen sich nach dem derzeitigen Kenntnisstand alle MAB in folgende Gattungen einteilen: *Methylosinus*, *Methylocystis* und *Methylocella* (Typ-II-MAB) sowie *Methylomonas*, *Methylomicrobium*, *Methylobacter*, *Methylocaldum*, *Methylosphaera* und *Methylococcus* (Typ-I-MAB).

Die CH_4 -Oxidation der aeroben MAB wird durch Methan-Monooxygenasen initiiert (MMOs), wobei zwei unterschiedliche Enzyme charakterisiert wurden. Die lösliche Methan-Monooxygenase (sMMO) ist nur in einigen MAB vorhanden (überwiegend in Typ-II-MAB sowie in den Typ-I-Organismen *Methylococcus capsulatus* und *Methylomonas* spp.), benutzt NADH als e^- -Donator und besitzt keine Häm- oder andere Kofaktoren (Dalton *et al.*, 1993, Nakajima *et al.*, 1992). Die partikuläre Methan-Monooxygenase (pMMO) ist

membrangebunden und kommt wahrscheinlich, mit Ausnahme von *Methylocella palustris* (Dedysh *et al.*, 1998), in allen MAB vor. Sie besteht aus drei Untereinheiten, enthält 2 bis 3 Cu-Cluster im aktiven Zentrum und ist direkt an die Elektronentransportkette gekoppelt (Zahn und Dispirito, 1996, Nguyen *et al.*, 1998). Trotz ihrer anscheinenden Funktionsgleichheit in der Zelle, zeigen sMMO und pMMO keinerlei genetische oder strukturelle Homologien. Dagegen konnte gezeigt werden, daß die Enzyme pMMO und AMO einander homolog sind, wobei Vergleiche zwischen den abgeleiteten Aminosäuresequenzen eine Ähnlichkeit von mehr als 40 % ergaben (Holmes *et al.*, 1995). Das durch die Umsetzung von CH₄ entstandene Methanol wird von MAB und anderen methylo trophen Organismen mittels der Methanoldehydrogenase (MDH) in Formaldehyd umgewandelt. Auf dieser Stufe assimilieren MAB den für die Synthese von Zellmasse benötigten Kohlenstoff. Dies erfolgt bei MAB jedoch auf zwei unterschiedlichen Stoffwechselwegen, entweder dem Ribulose-Monophosphat-Weg (Typ-I-MAB) oder dem Serin-Weg (Typ-II-MAB).

Molekular-ökologische Studien

Nach den ersten Erfolgen bei der Isolation von MOB vor ungefähr 100 Jahren (Winogradsky, 1891; Söhngen, 1906), wurden eine Reihe von weiteren Reinkulturen beschrieben, welche wichtige Einblicke in die physiologische und taxonomische Vielfalt von AAOB und MAB vermittelten (Whittenbury *et al.*, 1970; Heyer, 1977; Jones *et al.*, 1988; Koops *et al.*, 1992). Die traditionell angewandten Anreicherungs- und Kultivierungstechniken sind aber letztlich aus zweierlei Hinsicht nur begrenzt geeignet, die Diversität und Verbreitung dieser Mikroorganismen aufzuzeigen. Zum einen sind MOB sehr langsam wachsende Bakterien und liefern nur geringe Zellerträge, wodurch sich die "klassischen" mikrobiologischen Methoden zur Beantwortung ökologischer Fragestellungen zu zeitaufwendig und langwierig gestalten (Hanson und Hanson; 1996, Matulewich *et al.*, 1975; Ford *et al.*, 1980). Zum anderen entsprechen die meisten Kultivierungsbedingungen nicht den *in situ*-Bedingungen, und daher werden solche Mikroorganismen selektiv angereichert, welche an die artifiziellen Bedingungen gut adaptiert sind. Eine der fundamentalen Erkenntnisse in der Mikrobiologie der letzten Jahre war, daß die überwältigende Mehrheit der tatsächlich in der Natur existierenden Bakterien bislang nicht kultiviert wurden. Es wird angenommen, daß der Anteil bisher kultivierter Prokaryoten lediglich ca. 1 % aller existierenden Mikroorganismen ausmacht (Ward *et al.*, 1990; Amann *et al.*, 1995). Aufgrund des Unvermögens der vorhandenen Kultivierungstechniken, die Biodiversität in ihrer Gesamtheit zu erfassen, wurden kultivierungsunabhängige, molekulare Methoden zur Beschreibung mikrobieller Populationen entwickelt. Diese haben in den letzten Jahren zur Beantwortung grundlegender ökologischer Fragestellungen immer mehr an Bedeutung gewonnen (Amann *et al.*, 1995; Amann und Ludwig, 2000). Über PCR- und Klonierungstechniken konnten 16S rDNA-

Sequenzen von bislang nicht identifizierten Bakterien in einer Vielzahl von Umweltproben nachgewiesen werden (Liesack und Stackebrandt 1992; Rheims *et al.*, 1996; Bornemann und Triplett, 1997). Neben der breiten Anwendung universeller 16S rDNA-Nachweissysteme für Mitglieder der Domänen *Bacteria* und *Archaea* wurden auch spezifische 16S rDNA-Primersysteme formuliert, um AAOB der *Nitrosomonas/Nitrospira*-Gruppe (Head *et al.*, 1993; Hiorns *et al.*, 1995; Stephen *et al.*, 1996) bzw. MAB innerhalb der α - oder γ -*Proteobacteria* (Holmes *et al.*, 1995; McDonald *et al.*, 1996; Wise *et al.*, 1999) in Umweltproben nachzuweisen. Zur spezifischen Detektion und Quantifizierung von MAB wurden erfolgreich Sonden für die 16S rRNA-gerichtete Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) (Tsien *et al.*, 1990; Hanson *et al.*, 1993) eingesetzt.

Für ökologische Untersuchungen sind 16S rDNA-Analysen jedoch nur begrenzt informativ, da sie in erster Linie phylogenetische Informationen liefern und so gut wie keine Aussagen über die Funktion des detektierten Organismus zulassen. Aufgrund der hohen Konservierung und des phylogenetischen Charakters der 16S rDNA besteht auch das Risiko, daß die zur PCR-Amplifikation eingesetzten Primer mit der Ziel-DNA von Organismen kreuzreagieren, die zu anderen physiologischen oder phylogenetischen Gruppen gehören. Somit kann es bei der Analyse von Umweltproben, mit einem komplexen Bestand von größtenteils unbekannten Sequenztypen zur Detektion „falsch-positiver“ Sequenzen kommen (Stephen *et al.*, 1996, Pommerening-Röser *et al.*, 1996). Besonders problematisch sind Untersuchungen zur Diversität von MAB, da diese in mindestens zwei monophyletischen Clustern innerhalb der α - und γ -*Proteobacteria* gruppieren. Die MAB können daher *per se* nicht mit einem einzigen 16S rDNA-Nachweissystem erfaßt werden.

Als Alternative zur 16S rDNA als Markermolekül, wurden in den letzten Jahren PCR-Systeme zum Nachweis funktioneller Gene, die für MOB charakteristisch sind, entwickelt. Dadurch wurde die Detektion physiologisch distinkter Organismengruppen möglich. Der Einsatz von Strukturgenen für die molekulare Umwelt-Analytik lieferte somit Einblicke in die funktionelle Diversität in einem bestimmten Habitat. Auf Basis des Gens *amoA*, das für die α -Untereinheit des Enzyms AMO kodiert, entwickelte Rotthauwe *et al.*, (1997) ein PCR-Nachweissystem, mittels dem natürliche Populationen der *Nitrosomonas/Nitrospira*-Gruppe in Reis-Mikrokosmen sowie in einigen Süßwasserhabitaten und in Klärwerksproben nachgewiesen werden konnten. Das Nachweissystem bewährte sich durch seine hohe Spezifität für *amoA*, was zuverlässige Umweltanalysen zur Diversität nitrifizierender Populationen ermöglichte. Auch zur molekularen Charakterisierung von MAB wurden eine Reihe von Nachweissystemen entwickelt. Das funktionelle Gen *mxoF*, das für die α -Untereinheit der Methanol-Dehydrogenase (MDH) kodiert, wurde als universeller Marker zur Erfassung aller methylophilen Organismen eingesetzt (McDonald und Murrell, 1997). Für die spezifische Detektion von CH_4 -Verwertern eignete sich das Markergen *pmoA*, welches

für die α -Untereinheit der partikulären Methan-Monooxygenase codiert. Ein auf Basis von *pmoA* entwickeltes Primersystem erlaubte die zuverlässige Identifikation methanotropher Populationen in verschiedenen Umwelten (Holmes *et al.*, 1995; McDonald und Murrell, 1997; Jensen *et al.*, 2000). Da es zudem auch potentiell das der *pmoA* homologe Gen *amoA* von AAOB erfaßt (Henckel *et al.*, 1999, Sarkano & Kerkhof, 1998), ist es besonders für Umweltstudien, in denen beide Organismengruppen charakterisiert werden sollen, geeignet. Zur Detektion von distinkten Gruppen von MAB, welche über eine lösliche Methan-Monooxygenase (sMMO) verfügen, wurden *mmoX*-basierende Nachweissysteme entwickelt (Großkopf, 1994; McDonald und Murrell, 1995; Shigematsu *et al.*, 1999). *mmoX* kodiert für die α -Untereinheit von sMMO.

Genetische „Fingerprinting“-Methoden

Die Charakterisierung der mikrobiellen Diversität über Klonierung und vergleichende Sequenzanalyse ist ein sehr zeitaufwendiges Verfahren. Darüber hinaus ist die Beschreibung von Änderungen in der Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft aufgrund sich ändernder physiko-chemischer oder biologischer Faktoren mit der Erstellung von Klonbibliotheken und Sequenzierung kaum möglich. Um die Dynamik mikrobieller Lebensgemeinschaften verfolgen zu können, wurden daher genetische „Fingerprinting“-Methoden eingesetzt. Hierzu zählen die denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE, Muyzer *et al.*, 1993; Henckel *et al.*, 1999), die Temperatur-Gradientengelelektrophorese (TGGE, Heuer und Smalla, 1997) und die Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (SSCP, Lee *et al.*, 1996). Alle diese Methoden erzeugen ein „Fingerprint“-Muster einer bakteriellen Lebensgemeinschaft durch die physikalische Trennung von gleichgroßen DNA-Molekülen in PCR-Produkten, die sich aus einer Vielzahl von Sequenztypen zusammensetzen. Die Trennung erfolgt dabei durch die sequenzspezifische Mobilität der DNA-Moleküle in einem Polyacrylamidgel, welche mittels eines chemischen Gradienten (Harnstoff/Formamid [DGGE], eines Temperaturgradienten [TGGE]) oder aufgrund der Konformationsänderungen von Einzelstrang-DNA [SSCP] erzielt wird. Eine alternative „Fingerprinting“-Technik ist die terminale Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (T-RFLP), welche bisher vor allem zur Analyse von 16S rDNA in Umwelt-PCR-Produkten eingesetzt wurde (Liu *et al.*, 1997; Lukow *et al.*, 2000). Eine Ausnahme bildet die T-RFLP-Analyse von Quecksilber-Resistenzgenen (Bruce *et al.*, 1998). Bei der T-RFLP-Analyse erfolgt eine Auftrennung ungleich großer DNA-Moleküle in einem Polyacrylamidgel, welche zuvor durch eine Restriktionsendonuklease sequenzspezifisch geschnitten worden waren. Durch die Endmarkierung eines Primers mit einem Fluoreszenzfarbstoff wird nur das terminale

Restriktionsfragment (T-RF) pro Sequenztyp sichtbar, wodurch die Analyse sehr komplexer T-RF-Profile möglich wird.

Die Bedeutung der Reispflanze für die CH₄-Emission aus Reisfeldern

Wie bereits oben angesprochen sind überflutete Reisfelder eine der Hauptquellen der biogenen CH₄-Emission (Sass, 1994; IPCC 1992). Schätzungen über die jährlichen Emissionsraten von Reisfeldern reichen von 60 Tg (Prinn, 1994) bis 110 Tg (Cicerone und Oremland, 1988; Galchenko *et al.*, 1989). Der letzte Wert entspricht ungefähr 25 % der jährlichen Gesamtmenge des in die Atmosphäre freigesetzten CH₄ (Cicerone und Oremland, 1988; Galchenko *et al.*, 1989). Untersuchungen haben gezeigt, daß ungefähr 90 % des emittierten CH₄ durch das Aerenchym der Reispflanze und lediglich 10 % in Form von Gasblasen über das Flutwasser entweichen (Schütz *et al.*, 1989; Frenzel, 2000). In diesem Zusammenhang stellt das Aerenchym, das die Diffusion von atmosphärisches O₂ in die Wurzeln ermöglicht, aber nicht nur ein einfaches Gastransportsystem dar, sondern fungiert als dynamischer, oxygenierter Biofilter, der die Oxidation von CH₄ durch MAB erlaubt. Gilbert und Frenzel (1995) zeigten, daß die Aktivität der MAB an Reiswurzeln im direkten Zusammenhang mit der Verfügbarkeit von O₂ steht. Bis zu 30 % des in Reisfeldern produzierten CH₄ wird durch wurzelassoziierte MAB wieder reoxidiert (Conrad und Rothfuß, 1991; Denier van der Gon, 1996; Bosse und Frenzel, 1997). Umfangreiche Studien befaßten sich mit der Diversität von MAB im Reisfeldboden (Bodelier *et al.*, 2000; Henckel *et al.*, 2000b). Diese Untersuchungen belegten mit Hilfe von Fettsäure-Profilen, sowie mit DGGE-Analysen basierend auf 16S rDNA und *pmoA*, daß Typ-II-MAB die dominierenden methanotrophen Vertreter im undurchwurzelter Reisfeldboden und im Rhizosphärenboden sind. Bislang lagen jedoch nur begrenzte Informationen darüber vor, welche methanotrophe Populationen direkt mit den Reiswurzeln assoziiert sind. Aus terminalpositiven Verdünnungsstufen von MPN-Anreicherungen („most probable number“) konnten Typ-II-MAB isoliert werden (Gilbert und Frenzel, 1998). Dieser auf Kultivierungsexperimente basierende Befund kann aber, wie eingangs erwähnt, nicht als repräsentativ für eine möglicherweise viel komplexere methanotrophe Lebensgemeinschaft an der Reiswurzel angesehen werden.

Ziele dieser Arbeit

Auch wenn AAOB und MAB in vielen verschiedenen terrestrischen und aquatischen Standorten detektiert wurden, und viele Vertreter aus diesen beiden Gruppen als Reinkulturen bereits eingehend taxonomisch beschrieben wurden, so ist dennoch unser

Wissen über die Diversität und die strukturelle Zusammensetzung der Ammoniak-oxidierenden und methanotrophen Populationen sowie ihre Dynamiken und ihre Wechselwirkungen mit anderen Organismengruppen sehr begrenzt. Das Vorkommen und die Aktivität von MOB in terrestrischen Habitaten beschränkt sich z.B. nicht nur entlang oxisch/anoxischer Grenzflächen in wassergesättigten, anoxischen Böden (wie überflutete Reisfeldböden). Die methanotrophe Aktivität erstreckt sich vielmehr auch auf die Oxidation von atmosphärischem CH₄ in aeroben Böden, wie Waldböden oder Wiesenböden, wobei die hierfür verantwortlichen Mikroorganismen bislang nicht bekannt sind.

Ziel dieser Arbeit war es das Vorkommen und die Diversität von MOB in natürlichen Systemen mit molekularbiologischen Methoden zu untersuchen. Dabei sollten genetische „Fingerprints“ auf Basis funktioneller Gene erzeugt werden und die Aussagekraft der entstehenden Profile durch parallel durchgeführte, vergleichende Analyse von Umweltsequenzen evaluiert werden. Die dabei verwendeten Nachweissysteme werden im weiteren Text entsprechend den Zielgenen „*amoA*“, „*pmoA*“, „*mxnF*“ und „*mmoX*“ genannt.

Die in dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen zur Diversitätsbeschreibung von MOB fokussierte auf drei unterschiedliche ökologische Fragestellungen:

1. Molekulare Charakterisierung von AAOB in verschiedenen Umwelten.

Auf Basis des entwickelten Nachweissystems „*amoA*“ wurden von Rotthauwe (1997) erste Vorversuche in der Erstellung von T-RFLP-Profilen durchgeführt. Diese wurden an Reinkulturen und an definierten Gemischen von Reinkulturen erprobt. Eine Anwendung auf verschiedene natürliche Habitate war jedoch noch nicht erfolgt. Zudem war eine Korrelation zwischen terminalen Restriktionsfragmenten (T-RFs) zu distinkten Gruppen an *Nitrosomonas* spp. und *Nitrosospira* spp. noch nicht erarbeitet worden. In diesem Versuchsteil sollte daher die „*amoA*“-Datenbank ausgebaut und das diagnostische Potential der auf „*amoA*“ basierenden T-RFLP-Methode evaluiert werden.

2. Molekulare Charakterisierung von MAB an der Reiswurzel

Ziel dieses Versuchsteils war es die Diversität von MAB an Wurzeln von überfluteten Reispflanzen mit molekularbiologischen Techniken zu untersuchen. Die „*pmoA*“ (Holmes *et al.*, 1995) wurde als primärer Genmarker ausgewählt, da die pMMO für nahezu alle bekannten MAB ein essentielles, funktionelles Charakteristikum darstellt. Darüber hinaus sollte die T-RFLP-Methode zum spezifischen Nachweis methanotropher Populationen etabliert werden. Um die ökologische Signifikanz der auf „*pmoA*“ basierenden T-RFLP-„Fingerprints“ bewerten zu können, wurde neben der Sequenzierung klonierter *pmoA*-Gene

eine zusätzliche „Fingerprinting“-Methode eingesetzt. Diese basierte auf der *pmoA*-gestützten DGGE-Analyse (Henckel *et al.*, 1999). Um zu evaluieren, inwieweit das Potential der entwickelten Diagnostik auf Basis des Markergens *pmoA* die mikrobielle Diversität an der Reisswurzel in ihrer Gesamtheit erfaßt, erfolgte ergänzend eine vergleichende Sequenzanalyse klonierter Genabschnitte der Markergene *mxnF* (McDonald und Murrell, 1997), *mmoX* (Großkopf, 1994) sowie der 16S rDNA (Wise *et al.*, 1999).

3. Molekulare Charakterisierung von MAB in einem Wiesenboden

Unter aeroben Bedingungen wird sowohl das im Wiesenboden gebildete CH₄ als auch atmosphärisches CH₄ oxidiert (Segers, 1998; Van den Pol-van Dasselaar *et al.*, 1998). Generelle Umweltparameter, wie die Bodentemperatur (Czepiel *et al.*, 1995; Dobbie *et al.*, 1996), der Wassergehalt des Bodens (Czepiel *et al.* 1995; Jarvis *et al.*, 1994), der pH-Wert des Bodens (Hütsch *et al.*, 1994), die Art der landwirtschaftlichen Nutzung (Mosier *et al.*, 1991; Hütsch *et al.*, 1994) und die Verfügbarkeit von Stickstoffquellen (Hütsch *et al.*, 1994; Willison *et al.*, 1996) haben einen Einfluß auf die CH₄-Oxidation in Wiesenböden. Das Vorkommen und die Diversität der für die CH₄-Oxidation in Wiesenböden verantwortlichen Mikroorganismen wurde jedoch bislang nicht mit molekularbiologischen Methoden untersucht. In diesem Versuchsteil sollten daher erste molekulare Daten zur Charakterisierung der methanotrophen Lebensgemeinschaft eines Wiesenbodens erhoben werden. Als zentraler Genmarker wurde auch hier das Nachweissystem „*pmoA*“ für die Durchführung von T-RFLP-Analysen und DGGE eingesetzt. Die Analysen von DGGE-gestützten 16S rRNA-Genen sollten zusätzliche Aufschlüsse über MAB in diesem Habitat geben. Um einen ersten Einblick in die jahreszeitliche Populationsdynamik zu erhalten, wurden sowohl Winterproben als auch Sommerproben analysiert.

III. Material und Methoden

1 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden sämtliche Chemikalien in p. A.-Qualität von den Firmen Boehringer Mannheim (Mannheim), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt) und Sigma (St. Louis, USA) bezogen. Enzyme sowie andere molekularbiologische Reagenzien wurden von Amersham (Braunschweig), Applied Biosystems (Weiterstadt), Biozym (Oldendorf), Metabion (Planegg-Martinsried) und Promega (Mannheim) bezogen.

2 Sterilisationsverfahren

Alle in der Arbeit verwendeten Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Lösungen und Puffer wurden durch Autoklavieren (121°C, 20 min) sterilisiert.

3 Bakterienkulturen und Umweltproben

3.1 Bakterienkulturen

Für die Durchführung von T-RFLP-Analysen wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Kulturen verwendet:

Tabelle 1: Reinkulturen für Sequenzierung und T-RFLP-Analyse

Reinkulturen	Herkunft
<i>Nitrosomonas europaea</i> C-31	ATCC 25978
<i>Nitrosomonas halophila</i> Nm1	a
<i>Nitrosomonas nitrosa</i> Nm90	a
<i>Nitrospira</i> sp. L13	a
<i>Nitrospira multiformis</i> C-71	ATCC 25196
<i>Methylococcus capsulatus</i> Bath	NCIMB 11131
<i>Methylocystis parvus</i> OBBP	NCIMB 11129
<i>Methylomonas methanica</i> S1	NCIMB 11130

Abkürzungen: ATCC: American Type Culture Collection, Rockville; NCIMB: National Collections of Industrial and Marine Bacteria Ltd; a: K.-P. Witzel, MPI für Limnologie, Plön

3.2 Umweltproben

Für die Detektion von AAOB und MAB wurden Umweltproben aus unterschiedlichen Habitaten untersucht.

A: Ammoniak-Oxidierer (AAOB)

Die T-RFLP-gestützte Charakterisierung von AAOB auf Basis von *amoA*-Genen stellte die Weiterführung einer vorangegangenen Studie dar, in der Umweltsequenzdaten über Klonierung erhoben wurden (Rotthauwe *et al.*, 1997, Rotthauwe 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde das gleiche Untersuchungsmaterial verwendet, um die Ergebnisse von Sequenz- und T-RFLP Analyse in Korrelation zu bringen. Die untersuchten Umweltproben sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet.

Tabelle 2:

Probenmaterial für die <i>amoA</i> -Analysen				
Umweltprobe	Habitat	Name	Herkunft	Beschreibung
	Reisfeldboden	RR60H	Reismikrokosmen	Rotthauwe <i>et al.</i> , 1997
		RR90		
	Süßwasser	Plußsee	See in Schleswig-Holstein	Ward <i>et al.</i> , 1996
		TUK	Teich in Kirchhain (Hessen)	Rotthauwe <i>et al.</i> , 1997
	Belebtschlamm-becken	SP	Klärwerk in Schleswig-Holstein	Ward <i>et al.</i> , 1996
		ASK	Klärwerk in Kirchhain (Hessen)	Rotthauwe <i>et al.</i> , 1997
Anreicherung	Süßwasser	Schöhsee	See in Schleswig-Holstein	Ward <i>et al.</i> , 1996
	Ostsee	OST	Hohwachter Bucht (Deutschland)	Ward <i>et al.</i> , 1996

B: Methanotrophe Bakterien (MAB)Reiswurzeln

Für die Untersuchung von Reiswurzeln wurde Material aus drei unterschiedlichen Mikrokosmen verwendet. Die Reismikrokosmen wurden in den Jahren 1995, 1997 und 1999 am Max-Planck-Institut in Marburg angesetzt (Rotthauwe *et al.*, 1997, Großkopf *et al.*, 1998 und Graff 2000). Die Inkubation und Behandlung der gefluteten Reismikrokosmen erfolgte ungedüngt unter definierten Gewächshausbedingungen (Frenzel und Bosse, 1996). Die Vegetationsdauer und Probenbezeichnung der jeweiligen Reispflanzen ist nachfolgend angegeben:

<u>Jahr</u>	<u>Vegetationsdauer</u>	<u>Probenbezeichnung</u>
1995	90 Tage	W90
1997	84 Tage	W84
1999	70 Tage	W70

Wiesenboden

Für die Untersuchung von MAB in Wiesenböden wurde der gut charakterisierte Standort der Umweltbeobachtungs- und Klimafolgenforschungsstation in Linden (nähe Gießen) gewählt. Diese Forschungsstation wird vom Institut für Pflanzenökologie und der Hessischen Landesanstalt für Umwelt betrieben und befaßt sich mit den Folgen von Veränderungen der Luftzusammensetzung und des Klimas auf terrestrische Ökosysteme. Eine nähere Charakterisierung des Versuchsgeländes kann aus dem Jahresbericht von Grünhage *et al.*, (1995) entnommen werden. Im folgenden sollen nur einige wesentliche Eckdaten aufgelistet werden: Die ca. 4,5 ha große Wiesenfläche wird seit Jahrzehnten intensiv mit Stickstoff gedüngt (ca. 50-80 kg x ha⁻¹ x a⁻¹) bei zwei Schnitten pro Jahr. Die Wiese wird als eine wechselfeuchte Glatthaferwiese bezeichnet, in der 12 verschiedene Gräser, 2 Leguminosen und 15 Kräuter einen dominanten Pflanzenbestand von über 60 % erreichen. Der Boden besteht vorwiegend aus tonigen und in geringem Maße aus sandigen Sedimenten, die von Auensedimenten überdeckt werden.

4 Behandlung des Probenmaterials

Während das Probenmaterial für die *amoA*-Analysen (Tab. 1) weitgehend als DNA-Extrakte vorlagen (Rotthauwe *et al.*, 1997), wurden die Reiswurzeln und der Wiesenboden vor der molekularen Analyse wie nachfolgende beschrieben, behandelt.

4.1 Vorbehandlung

A: Reiswurzeln

Die Reiswurzeln wurden nach der Entfernung von der Pflanze zunächst mit Leitungswasser sorgfältig von Bodenpartikeln befreit und anschließend in PBS-Puffer gewaschen.

PBS-Puffer, pH 7,2:

7 mM Na_2HPO_3

3 mM NaH_2PO_3

130 mM NaCl

Danach wurden die Wurzeln in ca. 1 cm große Stücke geschnitten und lyophilisiert. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte eine Lagerung bei -20°C .

B: Wiesenboden

Gestochene Bodenkerne (Durchmesser: ca. 30 mm) wurden im Winter (Februar) und Sommer (Juni) an der gleichen Stelle (Entnahme von der Oberfläche bis 10 cm Tiefe) entnommen, und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Der Wiesenboden wurde zum einen direkt für die DNA-Extraktion eingesetzt, und zum anderen erfolgte zusätzlich eine Inkubation unter einem definierten CH_4 -Mischungsverhältnis. Hierzu wurden in 120 ml Serumflaschen (Müller & Krempel, Bülach, Schweiz) 20 g feuchter Boden eingewogen. Das Gefäß wurde mit einem Butyl-Gummistopfen verschlossen und anschließend mit Hilfe einer Injektionsnadel mit Methan begast. Die Gasphase betrug einen CH_4 -Gehalt von ca. 40.000 ppmv. Die Veränderung des CH_4 -Gehaltes wurde gaschromatographisch mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) gemessen. Die Flaschen wurden im Dunkeln bei 25°C für zwei Wochen inkubiert. Die CH_4 -Messung erfolgte im 24 h-Rhythmus.

4.2 Nukleinsäure-Extraktion

4.2.1 Nukleinsäure-Extraktion aus Reiswurzeln

Es kamen zwei unterschiedliche Extraktionstechniken zum Einsatz. Hochmolekulare Umwelt-DNA wurde aus den Wurzelproben M90 und M84 nach einem Protokoll von Großkopf *et al.*, (1998) isoliert (Protokoll 1). Die Gesamtnukleinsäure-Extraktion, beschrieben für Bodenmaterial nach Lüdemann *et al.*, (1999), wurde für die Wurzelprobe M70 angewendet (Protokoll 2).

Protokoll 1: Extraktion hochmolekularer Umwelt-DNA

Extraktionspuffer

Tris-HCl, pH 8,0	100,0 mM
EDTA, pH 8,0	50,0 mM
NaCl	500,0 mM
Dithiothreitol (DTT)	1,0 mM

TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer)

Tris-HCl, pH 8,0	10,0 mM
EDTA, pH 8,0	1,0 mM

Ca. 100 mg lyophilisiertes Wurzelmaterial wurden mit dem Mörser unter Zugabe von flüssigem Stickstoff homogenisiert. Das Material wurde anschließend in 1 ml Extraktionspuffer aufgenommen. Vor der enzymatischen Lyse wurde die Probe dreimal für je zwei Minuten eingefroren und wieder aufgetaut („Gefrier-Tau-Prozedur“; - 70°C/+ 65°C). Danach erfolgte die Zugabe von 2 mg Lysozym (40 µl einer 50 mg/ml-Lösung). Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37° C wurden 0,1 mg Proteinase K (5 µl einer 20 mg/ml-Lösung) und 50 µl einer 10 %-igen SDS-Lösung hinzugefügt. Es folgte eine erneute Inkubation für 1 h bei 37°C. Anschließend wurde die SDS-Gesamtkonzentration durch Zugabe von 150 µl der 10 %-igen SDS-Lösung auf 2 % erhöht und die Probe für 10 min bei 65°C inkubiert. Dann wurden 0,4 ml einer 5 M KAc-Lösung zugesetzt und die Probe für 20 min auf Eis gestellt. Um Zelltrümmer, Pflanzenbestandteile und nicht in Lösung befindliche Verunreinigungen zu entfernen, erfolgte eine Zentrifugation bei 13.000 x g für 15 min. Nach der Überführung des DNA-haltigen Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß erfolgte je eine Ausschüttlung mit gleichem Volumen Chloroform und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1), wobei jeweils für 3 min bei 13.000 x g zur Phasentrennung zentrifugiert wurde. Die Umwelt-DNA wurde durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol für 30 min bei RT gefällt. Nach erneuter

Zentrifugation bei 13000 x g für 15 min wurde das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen, getrocknet (GeneVac SF50, Biometra, Göttingen) und in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Protokoll 2: Extraktion von Gesamtnukleinsäure

TPM-Puffer

Tris-HCl pH 7,5	50,0 mM
Polyvinylpyrrolidon 25	1,7 % (w/v)
MgCl ₂	20,0 mM

Lyse-Puffer

Tris-HCl pH 7,5	50,0 mM
EDTA	10,0 mM
H ₂ O-gesättigtes Phenol	6 % (v/v)

TMC-Puffer

Tris-HCl, pH 7,5	10,0 mM
MgCl ₂	5,0 mM
CsCl ₂	0,1 mM

0,5 g frisches Wurzelmaterial wurde in einem 2 ml-Reaktionsgefäß mit 1 g Glasperlen und 700 µl vorgekühlten TPM-Puffer gemischt und die Suspension im Zellhomogenisator (Biodismembrator S, Braun Biotech International, Melsungen) für 60 sek bei 2400 UpM geschüttelt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 13.000 x g und 4°C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde in 700 µl Lyse-Puffer aufgenommen und die Suspension erneut im Zellhomogenisator geschüttelt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde dieser zweite Überstand mit dem ersten Überstand vereint. Es folgte eine sukzessive Ausschüttlung mit gleichen Volumina von Wasser-gesättigtem Phenol, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, v/v/v) und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v). Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte abschließend für 60 min bei RT durch Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Natrium-Acetat und 3 Vol. Ethanol absolut. Nach einer Zentrifugation bei 13000 x g für 20 min und 4°C wurde das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen, getrocknet (GeneVac SF50, Biometra, Göttingen) und in 100 µl DEPC-vorbehandeltem dest. H₂O (0,1 % DEPC) aufgenommen.

Von dieser Nukleinsäurelösung wurde die Hälfte entnommen und für spätere DNA-Analysen bei -20°C aufbewahrt. Die verbleibende Menge wurde einer DNase-Behandlung unterzogen. 1 Vol. TMC-Puffer und 5 U RNase-freie DNase (Promega, Mannheim) wurden zur Lösung gegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 Vol.

Chloroform gestoppt. Es folgte eine erneute Präzipitation der RNA wie oben beschrieben. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

4.2.2 Nukleinsäure-Extraktion aus Wiesenboden

Die DNA-Extraktion aus Wiesenboden erfolgte in leicht abgewandelter Form nach einem für Reisfeldboden beschriebenen Extraktionsprotokoll (Großkopf *et al.*, 1998, Henckel *et al.*, 1999).

Natriumphosphatpuffer 0,1M, pH 8,0

1M Na ₂ HPO ₄ -Lsg.	93,2 ml
1M NaH ₂ PO ₄ -Lsg	6,8 ml
dest. H ₂ O ad 1 l	

TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer)

Tris-HCl, pH 8,0	10,0 mM
EDTA, pH 8,0	1,0 mM

0,5 g Boden (Feuchtgewicht) wurde in 0,5 ml Natrium-Phosphat-Puffer suspendiert. Nach Zugabe von 80 µl 10 %iger SDS-Lösung und 0,5 g Glasperlen (180 µm Durchmesser, Braun Biotech International, Melsungen) erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei 60°C. Die Probe wurde anschließend für 60 sek im Zellhomogenisator bei 2400 UpM geschüttelt. Um Zelltrümmer, Pflanzenbestandteile und nicht in Lösung befindliche Verunreinigungen zu entfernen, erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 13000 x g und 4°C. Der Überstand wurde dreimal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v), wie oben beschrieben ausgeschüttelt. Die DNA wurde abschließend durch eine einstündige Inkubation bei RT durch Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Natrium-Acetat-Lösung und 2,5 Vol. Ethanol absolut ausgefällt. Die weitere Behandlung der DNA bis zur Aufnahme in 100 µl TE erfolgte wie unter 6.1 beschrieben.

Der Reinheitsgrad der so gewonnenen DNA reichte noch nicht für eine PCR-vermittelte Amplifikation aus. Es wurde ein Aufreinigungsprotokoll auf der Basis von Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP), welches co-extrahierte Huminstoffe aus dem Boden bindet, angewendet (Holben *et al.*, 1988).

Aufreinigung

15 g PVPP (Sigma, St. Louis, USA) wurden in 200 ml 3 M HCl für 14 h durch Rühren suspendiert. Das PVPP wurde danach in 10 mM Tris-EDTA-Puffer, pH 8,0 (Holben *et al.*,

1988) equilibriert. Die PVPP-TE -Suspension wurde abschließend mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt und bei 4°C gelagert. Zur Aufreinigung der DNA wurden ca. 0,5 ml der PVPP-Lösung in Mikro Bio-Spin Chromatographie-Säulen (Biorad, München) gefüllt und bei 375 x g für 1 min trocken zentrifugiert. Der Vorgang wurde so oft wiederholt, bis die Säule mit ca. 1 ml PVPP blasenfrei und trocken gepackt war (ca. dreimal). Die DNA-Lösung wurde dann auf die Säulenmatrix gegeben und bei 375 x g für 2 min zentrifugiert. Das DNA-Eluat war nun weitgehend von Huminstoffen befreit. Es konnten jedoch noch keine starken Amplifikationssignale erzielt werden. Um dies zu erreichen, wurde die DNA zusätzlich über Qiagen-Spin-Säulen (Qiagen, Hilden) nach Herstelleranweisung aufgereinigt. Auf diese Weise wurden weitere PCR-Hemmstoffe wie Salze und SDS aus der Lösung gezogen. Danach konnten Amplifikationsprodukte erzeugt werden. Die Lagerung der aufgereinigten DNA erfolgte bei 4°C.

4.3 Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer), 50 x konzentriert

Tris-HCl	40,00 mM
Natriumacetat	8,30 mM
EDTA	0,38 mM

mit Essigsäure auf pH 7,8 eingestellt

Auftragspuffer (Endkonzentration)

Saccharose	40,00%
Bromphenolblau	0,25%
Xylencyanol FF	0,25%
Orange G2	0,25%

Größenstandards

„Smart-Ladder“, Eurogentech, Seraing, Belgien

Zur Ermittlung der mittleren Molekülgröße sowie zur quantitativen Abschätzung der isolierten DNA-Menge bzw. der generierten PCR-Amplikons wurden Aliquots von jeweils 5 µl mit 0,2 Vol. Auftragspuffer vermischt und in die Taschen eines 1 %-igen TAE-Agarosegels pipettiert. Die Auftrennung erfolgte in einer mit 1 x TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer für ca. 45 min. Die angelegte Spannung betrug etwa 4 V/cm. Als Größen- und Mengenstandard

wurde die „Smart-Ladder“ verwendet. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in einer 0,001 %-igen Ethidiumbromid-Lösung für 30 min gefärbt und anschließend mit einer Video-Kamera (Gel Print 2000i, BioPhotonics Corporation, Ann Arbor, USA) aufgenommen.

4.4 PCR-Amplifikation

Die molekulare Analyse von AOB und MOB startete mit der spezifischen *in vitro* DNA Synthese der funktionellen und phylogenetischen Genabschnitte.

4.4.1 Amplifikation von DNA

Alle Reaktionsansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Als Negativkontrolle diente ein PCR-Ansatz mit H₂O anstelle von Matrizen-DNA. Der PCR-Ansatz für eine Reaktion bestand aus 25 µl des „MasterAmp 2 x PCR Premix“ (Epicentre Technologies, Madison, USA), 0,3 µM pro Primer, und 2,5 U Taq-Polymerase. Das Reaktionsgemisch wurde mit sterilem Wasser auf das Endvolumen von 50 µl aufgefüllt. Der MasterAmp 2 x PCR Premix enthielt 100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 100 mM KCl, 7 mM MgCl₂, 400 µM pro Desoxynukleosidtriphosphat und einen vierfach konzentrierten vom Hersteller nicht näher definierten „PCR-Enhancer“. Zur Amplifikation wurde das Gerät GeneAmp PCR System 2400 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) verwendet. Die in dieser Arbeit eingesetzten Primer, die Größe der jeweils erzeugten Amplikons und die jeweiligen Temperaturprofile sind in Tabelle 3 beschrieben:

Die Reaktionen für alle PCR-Systeme starteten mit einer zweiminütigen Denaturierungsphase von 94°C. Nach Durchlauf der in Tabelle 3 angegebenen Zyklen schloß sich eine finale, siebenminütige Elongationsphase von 72°C an. Abschließend wurde der Heizblock auf 4°C heruntergekühlt.

Tabelle 3: Primer-Beschreibung und PCR-Bedingungen für die unterschiedlichen Nachweissysteme basierend auf funktionellen und phylogenetischen Genmarkern

Primer-Paar ¹	Sequenz (5' - 3')	Zielgen + Fragmentlänge (in Bp)	Temperatur- profil (C°)	Referenz
amoA-1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	amoA (491)	94°C, 60s 55°C, 90s 72°C, 90s 33 Zyklen	Rotthauwe <i>et al.</i> , 1997
amoA-2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC			
f1003	GCGGCACCAACTGGGGCTGGT	mxoF (557)	94°C, 60s 55°C, 30s 72°C, 60s 33 Zyklen	McDonald and Murrell, 1997
r1561	GGGCAGCATGAAGGGCTCCC			
A189	GGNGACTGGGACTTCTGG	pmoA (531)	94°C, 60s 62-52°C ² , 30s 72°C, 45s 30 Zyklen	Holmes <i>et al.</i> , 1995
A682	GAASGCNGAGAAGAASGC			
mmoX1109f	CCGCTGTGGAAGGGCATGAA	mmoX (863)	94°C, 60s 65-55°C ² , 60s 72°C, 60s 32 Zyklen	Großkopf, 1994
mmoX1949r	CACTCGTAGCGCTCCGGCTC			
MethT1dF	CCTTCGGGMGCYGACGAGT	16S rDNA von Typ-I-MAB (922)	94°C, 30s 56°C, 45s 72°C, 90s 30 Zyklen	Wise <i>et al.</i> , 1999
MethT1aR	GATTCYMTGSATGTCAAGG			
MethT1dF	CCTTCGGGMGCYGACGAGT	16S rDNA von Typ-I-MAB (556)	94°C, 30s 56°C, 45s 72°C, 90s 30 Zyklen	Wise <i>et al.</i> , 1999
MethT1bR	ATCCAATCGAGTCCCAGGTTAAGCCC			
27F	GAGTTTGATCMTGGCTCAG	16S rDNA von Typ-II-MAB (1008)	94°C, 30s 56°C, 45s 72°C, 90s 30 Zyklen	Lane, 1991
MethT2R	CATCTCTGRCSAYCATACCGG			Wise <i>et al.</i> , 1999
MB9αf	GTTCCGGAATAACTCAGGG	16S rDNA von Typ-II-MAB (391)	94°C, 60s 60°C, 30s 72°C, 60s 30 Zyklen	Tsien <i>et al.</i> , 1990
533R	TTACCGCGGCTGCTGGCAC			Weißburg <i>et al.</i> , 1991
MB10γf	AAGCGGGGGATCTTCGGACC	16S rDNA von Typ-I-MAB (336)	94°C, 60s 60°C, 30s 72°C, 60s 30 Zyklen	Tsien <i>et al.</i> , 1990
533r	TTACCGCGGCTGCTGGCAC			Weißburg <i>et al.</i> , 1991

¹ Die Primer in den grau schattierten Zeilen stellen die jeweiligen 5'-Primer dar.

² „Touchdown“-Verfahren: Nach jedem Zyklus wurde die Anlagerungstemperatur um 0,5°C gesenkt. Nach 20 Zyklen war die niedrigste Anlagerungstemperatur erreicht. Diese wurde dann bis zum Schluß der Reaktion beibehalten.

K = (G/T), M = (A/C), Y = (C/T)

4.4.2 RT-PCR bakterieller 16S rRNA

Aus der extrahierten RNA wurde in zwei Schritten doppelsträngige DNA *in vitro* synthetisiert. Mit Hilfe der reversen Transkriptase M-MLV RBase H minus (Promega, Heidelberg) wurde die RNA zunächst in einzelsträngige DNA umgeschrieben. In einem zweiten Schritt diente dieser DNA-Einzelstrang dann als Matrizen-DNA für die Synthese eines doppelsträngigen PCR-Produktes (ribosomale copy DNA = rcDNA). In dieser Arbeit wurden die Primer MethT1dF und MethT1bR (Tabelle 3) eingesetzt, um rcDNA von Typ-I-MAB [*γ-Proteobacteria*] zu synthetisieren.

Durchführung:

1 µl der extrahierten RNA (nach DNase-Verdau) wurde mit 60 pmol des Rückwärtsprimers MethT1bR gemischt und mit sterilem, RNase-freiem Wasser zu einem Volumen von 15 µl aufgefüllt. Zur Denaturierung der 16S rRNA-Sekundärstruktur erfolgte eine Inkubation für 5 min bei 70°C. Nach Abkühlung der Probe auf 4°C wurden 5 µl 5 x Reaktionspuffer (Promega, Heidelberg), 2,5 mM pro dNTP, 40 U Ribonuklease-Inhibitor (Promega, Heidelberg) und 200 U der M-MLV Reversen Transkriptase (Promega, Heidelberg) zugegeben. Die Inkubation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 25 µl für 1h bei 42°C. Für die nachfolgende PCR-Amplifikation wurde 1 µl dieser Probe verwendet. Die hierfür eingestellten PCR-Bedingungen können aus Tabelle 3 entnommen werden. Es wurden stets Kontrollreaktionen mit RNA-Aliquots unterschiedlicher Verdünnungsstufen durchgeführt, um sicherzustellen, daß die Proben frei von DNA sind, bzw. der DNase-Verdau vollständig abgelaufen war.

4.4.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Zum Entfernen der Salze, Enzyme, Nukleotide und nicht gebundene Primer wurden die PCR-Produkte mit dem „QIA-quick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium, Sambrook *et al.*, 1989)

10,0	g/l	Bacto-Trypton
5,0	g/l	Hefeextrakt
10,0	g/l	NaCl
15,0	g/l	Agar (für Platten)

Das Medium wurde durch Autoklavieren (30 min, 121°C) sterilisiert.

5 Molekulare Analysen

Für die Charakterisierung komplexer Lebensgemeinschaften von MOB in verschiedenen Umwelten kamen unterschiedliche Techniken zum Einsatz. AAOB wurden über vergleichende Sequenz- und T-RFLP-Analyse basierend auf dem Gen *amoA* untersucht. Die Detektion von MAB an Reiswurzeln erfolgte zum einen über die Sequenzanalyse phylogenetischer und funktioneller Gene und zum anderen über die T-RFLP-Analyse von *pmoA* und in geringerem Umfang über DGGE. Die DGGE-Analyse wurde in erster Linie für die Charakterisierung von MAB in Wiesenböden vorgenommen. Tabelle 4 zeigt, welches Nachweissystem für die jeweiligen Analysen eingesetzt wurde.

5.1 T-RFLP-Analysen

Bei der T-RFLP-Analyse werden genetische Fingerabdrücke einer komplexen Lebensgemeinschaft mittels der terminalen Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus-Analyse erstellt. Diese Methode wurde sowohl für 16S rRNA-codierende Gene (Liu *et al.*, 1997, Lukow *et al.*, 2000) als auch für funktionelle Gene (Bruce *et al.*, 1998, Horz *et al.*, 1999) durchgeführt. Die PCR-amplifizierten Genabschnitte werden mit Hilfe eines Restriktionsenzym sequenzspezifisch geschnitten. Aufgrund der Markierung eines der beiden Primer (in dieser Arbeit der 5'-Primer) wird nicht das komplette Fragmentmuster, sondern nur das terminale Restriktionsfragment (T-RF) pro Sequenztyp sichtbar. Auf diese Weise ist es möglich das Profil einer komplexen mikrobiellen Lebensgemeinschaft darzustellen, wobei die einzelnen T-RFs auf Basis bestehender Sequenzinformationen bestimmten phylogenetischen Gruppen zugeordnet werden können.

Elektrophoresepuffer:

Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer, pH 8,5 (Sambrook *et al.*, 1989)

Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2 mM

Durchführung

Der Restriktionsansatz enthielt 50-200 ng PCR-Produkt (entsprach ca. 2-8 µl der aufgereinigten PCR-Probe, 1 µl Inkubationspuffer und 10 U des Restriktionsenzym *TaqI*

(Erkennungssequenz: C'ATG) bzw. *MspI* (Erkennungssequenz: C'CGG) (alle Biochemikalien: Promega, Heidelberg). Das Gesamtvolumen wurde mit sterilem H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde dann gemäß den Angaben in Tabelle 4 inkubiert. Nach dem Verdau wurden 2,5 µl des Restriktionsansatzes mit 2 µl Formamid und 0,5 µl eines internen Längenstandards (GenScan 1000 Rox, Applied Biosystems, Weiterstadt) vermischt. Die Mischung wurde dann für 3 min bei 100°C zur Denaturierung der DNA inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der T-RFs auf einem 6 %-igen Polyacrylamidgel (24 cm Länge, Herstellung lt. Handbuch „Model 373 DNA Sequencing System, User`s Manual“, PE Applied Biosystems, Weiterstadt). Das Gel setzte sich zusammen aus 1 x TBE-Puffer, 6 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 30 %ige Lösung (BioRad, München) sowie 8,3 M Harnstoff. Die Elektrophorese wurde in einem automatischen Sequenziergerät („sequencer“, Modell 373, PE Applied Biosystems, Weiterstadt) bei 2500 V und 40 mA in 1 x TBE-Puffer durchgeführt.

Die Auswertung der entstandenen T-RF-Profile erfolgte computergestützt mit der Analysesoftware (GeneScan Analysis Version 2.1, PE Applied Biosystems, Weiterstadt). Anhand des internen Längenstandards können die Größen der unterschiedlichen TR-Fs determiniert werden. Durch Integrierung der jeweiligen Fluoreszenzsignale ist die Quantifizierung der T-RFs innerhalb einer Probe möglich. Dies erlaubt Aussagen über die relative Abundanz eines bestimmten T-RFs im Hinblick auf die Summe der Fluoreszenzsignale aller Fragmente innerhalb einer Probe.

Tabelle 4: Übersicht über die Detektionssysteme und ihr Einsatz für die verschiedenen molekularen Analysen. Die jeweils modifizierten Primer sind entsprechend gekennzeichnet.

Nachweissystem	Genbibliothek basierend auf	Primer-Paar	T-RFLP Allgemeine Bedingungen	DGGE Allgemeine Bedingungen
<i>amoA</i>	DNA	amoA-1F	*	n.d.
		amoA-2R	<i>TaqI</i> , 3 h, 65 °C	
<i>mxoF</i>	DNA	f1003	n.d.	n.d.
		r1561		
<i>pmoA</i>	DNA	A189*	*	GC-Klammer 1
		A682	<i>MspI</i> 3 h, 37°C	35-80%, 15 h, 74 V
<i>mmoX</i>	DNA	mmoX1109f	n.d.	n.d.
		mmoX1949r		
MethT1A	DNA	MethT1dF	*	n.d.
		MethT1aR	<i>MspI</i> 3 h, 37°C	
MethT1B	DNA + RNA	MethT1dF	*	n.d.
		MethT1bR	<i>MspI</i> 3 h, 37°C	
10γ	n.d.	MB10γf	n.d.	40-70%, 15 h, 64 V
		533r		GC-Klammer 2
MethT2	DNA	27F	n.d.	n.d.
		MethT2R		
9α	n.d.	MB9αf	n.d.	40-70%, 15 h, 64 V
		533R		GC-Klammer 2

* = 5' Carboxyfluoreszein-Markierung

GC-Klammer 1: 5'-ccccccccccccgcgccccgcgccccgcgccccgcgccc (Henckel *et al.*, 1999)

GC-Klammer 2: 5'-cgccccgcgccccgcgccccgcgccccgcgccccgcgccc (Henckel *et al.*, 1999)

n.d. = nicht durchgeführt

5.2 DGGE-Analysen

Die zweite in der Arbeit durchgeführte genetische „Fingerprinting“-Methode DGGE (denaturierende Gradientengelelektrophorese) basiert auf der elektrophoretischen Trennung amplifizierter, gleichgroßer Genabschnitte in einem denaturierendem Polyacrylamidgel mit linearem Formamid/Harnstoff-Gradienten. Aufgrund unterschiedlicher Sequenz denaturieren die aufzutrennenden Sequenztypen unterschiedlich schnell. Die entstehenden Sekundärstrukturen bewirken dann eine unterschiedlich hohe elektrophoretische Mobilität der DNA-Stränge. Die prinzipielle Durchführung der DGGE-Analysen erfolgte nach Henckel *et al.*, (1999). Die Dauer der Elektrophorese und die gewählte Spannungszahl wurden jedoch, wie in Tabelle 4 angegeben, neu eingestellt. DGGE-Analysen wurden mit den in Tabelle 4 angegebenen Nachweissystemen durchgeführt. Die entsprechend gekennzeichneten Primer enthielten am 5'-Ende die GC-Klammer, eine GC-reiche ungefähr 40 Basen lange Region, mit deren Hilfe vermieden wird, daß die DNA-Doppelstränge vollständig denaturieren und somit aus dem Gel auslaufen.

Die PCR-Produkte wurden mit dem Dcode System (BioRad, München) in 1-mm dicken Polyacrylamidgelen (6,5 % w/v Acrylamid:Bisacrylamid, 37,5:1) in 0,5 x TAE-Puffer, pH 7,4 aufgetrennt.

10 x TAE Puffer, pH 7,4

Tris-HCl	0,8 M
Natriumacetat	0,4 M
EDTA	0,02 M
Der pH-Wert wurde mit Eisessig eingestellt.	

Polyacrylamid Stammlösung 0 %-denaturierend

Acrylamid: Bis-Lösung (37,5:1)	6,5 %
10 x TAE	25 ml
ad. H ₂ O dest.	500 ml

Polyacrylamid Stammlösung 80 %-denaturierend

Acrylamid: Bis-Lösung (37,5:1)	6,5 %
10 x TAE	25 ml
Harnstoff	5,6 M
Formamid, deionisiert	32 %
ad. H ₂ O dest.	500 ml

Herstellung des Polyacrylamid-Gels und Elektrophorese

Durch die entsprechenden Mischungen aus obigen Stammlösungen wurden für jedes Gel zwei Arbeitslösungen (eine mit minimaler Menge denaturierender Agenz, die andere mit maximaler Menge denaturierender Agenz) hergestellt. Die Arbeitslösungen wurden in zwei getrennte Kammern, die miteinander verbunden werden können, gefüllt (je 12 ml). Die Polymerisierungsreaktion wurde durch Zugabe von je 60 µl 10 %-iger Ammoniak-Persulfat-Lösung und je 6 µl Temed (BioRad, München) gestartet. Mittels einer Peristaltik-Pumpe wurde die Gel-Apparatur gleichmäßig befüllt. Das Gel wurde abschließend mit ca. 5 ml 0 %-iger Polyacrylamidlösung (mit 26 µl 10 %-iger Ammoniak-Persulfat-Lösung und 2,6 µl Temed) überschichtet. Zur leichteren Handhabung der Gele nach der Elektrophorese wurden die Gele auf GelBond PAG Folien (FMC, Bioproducts, Rockland, USA) gegossen. Die Elektrophorese erfolgte wie in Tabelle 4 angegeben. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit dem 5×10^{-4} -verdünnten Fluoreszenz-Farbstoff Sybr-Green (Biozym, Hessisch-Oldendorf) für 30 min gefärbt und anschließend mit dem „Phosphorimager“ (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) aufgezeichnet.

Ausschneiden und Reamplifikation von DNA-Banden

Die Färbung mit Sybr-Green hat den Vorteil, daß die DNA im Nicht-UV-Bereich sichtbar gemacht werden kann, da Sybr-Green bei einer Wellenlänge von 497 nm angeregt wird und bei 520 nm emittiert (Molecular Probes, Eugene, USA). Dies erlaubt das Herausschneiden von DNA-Banden aus dem Gel, ohne sie durch UV-Strahlung zu zerstören. Mit dem Durchlichtgerät („Dark Reader“, Clare Chemical Research, Ross on Wye, UK) wurde das Gel beleuchtet und einzelne DNA-Banden mit sterilen 100-µl Pipettenspitzen, die zuvor am unteren Ende abgeschnitten wurden, ausgestochen. Die so herausgelöste DNA-Bande wurde in 200 µl steriles und DNA/RNA-freies Wasser (Braun, Melsungen) überführt und dann über Nacht bei 4°C gelagert. Durch passive Diffusion ging die in dem Polyacrylamid-Gel befindliche DNA in Lösung. Zur Reamplifikation der ausgestochenen Banden wurden die Proben kurz durchmischt und dann 0,5 µl-Aliquots davon direkt in die PCR eingesetzt. Die entsprechenden PCR-Bedingungen waren wie oben beschrieben, es wurden jedoch Primer ohne GC-Klammer verwendet und die Zyklenzahl auf 28 reduziert. Reamplifikationsprodukte wurden wie oben beschrieben mit Quiaquick-Säulen gereinigt und danach in die Sequenzierung eingesetzt.

5.3 Erstellung von Klonbibliotheken

Mit den aus Umwelt-DNA synthetisierten Amplikons (16S rRNA-Gene und funktionelle Gene) wurden Klonbibliotheken hergestellt. Damit wurden die Gemische unterschiedlicher Sequenztypen voneinander getrennt und konserviert. Durch die Sequenzierung der einzelnen Klone konnten konkrete phylogenetische über die Diversität von MOB in unterschiedlichen Habitaten gemacht werden konnten.

5.3.1 Herstellung von LB-Agarplatten

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium, Sambrook *et al.*, 1989)

10,0	g/l	Bacto-Trypton
5,0	g/l	Hefeextrakt
10,0	g/l	NaCl
15,0	g/l	Agar (für Platten)

Das Medium wurde durch Autoklavieren (30 min, 121°C) sterilisiert. Nach dem Abkühlen auf 50°C wurde dem Medium Kanamycin (30 µg/ml Endkonzentration) sterilfiltriert zugesetzt.

X-Gal-Vorratslösung (4 %, w/v):

40 mg 5-Bromo-4-chloro-β-D-galactopyranosid (X-Gal) wurden in 1 ml Dimethylformamid gelöst und lichtgeschützt bei -20°C gelagert. 25 µl dieser Lösung wurden 15 min vor der Ausplattierung der Zellen auf die Agarplatten gegeben.

5.3.2 Klonierung

Die Funktionsweise der Ligation beruht auf der Verbindung der am 3'-Ende des Amplikons befindlichen Adenosin-Überhänge mit dem entsprechend mit Desoxythymidin-Überhängen versehenen Plasmid-Vektors. Die Modifikation der PCR-Produkte mit Adenosin-Resten erfolgt durch die *Taq*-Polymerase während der DNA-Synthese, so daß die PCR-Produkte direkt für die Klonierung eingesetzt werden können. Die Selektion auf transformierten Zellen erfolgt durch die Kanamycin-Resistenz, welche durch den Vektor verliehen wird. Die Insert-Analyse wurde lediglich bei weißen Klonen durchgeführt. Diese sind nicht mehr in der Lage das künstliche Substrat X-Gal abzubauen, da durch erfolgreiche Ligation das Leseraster des entsprechenden Gens zerstört wurde. Die durch den Abbau von X-Gal entstehende, charakteristische Blaufärbung findet also nur bei Falsch-Positiven *E. Coli* -Zellen statt.

Die Klonierung wurde mit dem TOPO-TA-Cloning®-Kit (Invitrogen, de Schelp, Niederlande) nach Herstelleranweisung durchgeführt. Der Kit bestand aus dem Reaktionsmix für die

Ligation, SOC-Medium sowie kompetenten *E. coli*-Zellen („TOP 10“). Der Reaktionsmix für die Ligation enthielt folgende Bestandteile: den Vektor pCR® 2.1-TOPO (10 ng/μl), die Topoisomerase, 50 % Glycerin, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 0,1 % Triton X-100, BSA (100 μg/ml) und Phenolrot.

Positive Klone wurden mit einem sterilen Zahnstocher den Platten entnommen und auf neue LB-Kanamycin-X-Gal-Platten transferiert.

5.3.3 Anlegen von Glycerin-Stammkulturen

Für die Langzeitaufbewahrung wurden die Klone als Glycerin-Stammkulturen gelagert.

Glycerinpuffer:

Glycerin	56 % (v/v)
MgSO ₄	100 mM
Tris-HCl, pH 8,0	25 mM

800 μl Glycerinpuffer wurden in 2 ml-Kulturgefäße (Renner, Darmstadt) gegeben. Dazu wurden 800 μl von frischen Übernachtskulturen pipettiert und sofort in Flüssigstickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

5.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde mit Klonen und ausgeschnittenen DGGE-Banden durchgeführt. Reamplifizierte DGGE-Banden (siehe 5.2) wurden direkt in die Sequenzierung eingesetzt.

5.4.1 Analyse der Klone

Mit sterilen Zahnstochern wurden die Klone den Agarplatten entnommen und in 0,5 ml-Reaktionsgefäßen in 20 μl H₂O dest. für ca. 10 min aufgekocht. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 13000 x g wurden die DNA-haltigen Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt. Je 1 μl der so präparierten Plasmid-DNS wurde in eine PCR eingesetzt, mit der das klonierte Amplikon amplifiziert wurde. Hierfür wurden Primer verwendet, die komplementär zu Plasmidabschnitten sind, die das Insert flankieren.

Verwendete Plasmid-Primer:

M13F	5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'
M13R	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

Die PCR wurde wie unter Punkt (III.4.4.1) beschrieben durchgeführt. Die Anlagerungstemperatur für die Primer betrug 55°C, es wurden 30 Amplifikationsrunden

durchlaufen. Die Amplikons wurden über eine Silika-Matrix („Qiaquick Spin Columns“, Qiagen, Hilden) nach Herstelleranweisung aufgereinigt und dann in die Sequenzierungsreaktion eingesetzt.

5.4.2 Sequenzierungsreaktion

Das der Sequenzierungsreaktion zugrundeliegende Prinzip besteht in einer PCR-vermittelten Amplifikation mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase, wobei neben den üblichen Bausteinen (dNTPs) auch 5'-fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTPs) eingesetzt werden („Didesoxymethode“; Sanger *et al.*, 1977). Das Resultat ist eine statistisch verteilte Unterbrechung der Komplementärstrang-Synthese. Auf diese Weise entsteht ein Gemisch unterschiedlich langer 3'-fluoreszenzmarkierter DNA-Fragmente, deren Länge die Position eines bestimmten Nukleotids am Matrizenstrang wiedergibt. Die Terminatoren (ddATP, ddTTP, ddCTP und ddGTP) sind jeweils mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert (Emissionsmaxima zwischen 535-605 nm), so daß pro Sequenzierungsreaktion nur ein Ansatz erstellt werden mußte. Dieser setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 5: Sequenzierungsreaktion

Komponenten	Menge
H ₂ O	9 µl
DNS (ca. 30 ng/µl)	3 µl
Primer (ca. 3,8 µM)	2 µl
Sequenzierungskit	6 µl
Gesamt	20 µl

Für die Sequenzierungsreaktion wurde das „ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) verwendet. Der Kit enthielt neben der DNA-Polymerase Desoxynukleotide, fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide für die Termination, Tris-HCl (pH 9,0), MgCl₂ und eine thermostabile Pyrophosphatase. Für die Sequenzierungsreaktionen wurden die in Tabelle 3 beschriebenen PCR-Primer sowie die Plasmid-Primer M13 eingesetzt. Die Reaktion wurde mit dem GeneAmp PCR System 9600 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Das Temperaturprofil bestand aus der initialen Denaturierung bei 94°C für 3 min, gefolgt von 25 Zyklen bestehend aus 96°C für 10 sek, 50°C für 5 sec, und 60°C für 4 min mit abschließender Kühlung auf 4°C.

5.4.3 Analyse der Sequenzierungsprodukte

10x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer), pH 8,5

Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2 mM

Die Analyse der Syntheseprodukte erfolgte über eine Auftrennung auf einem fünf %-igen Polyacrylamidgel. Zuvor wurden die Proben mit Microspin G-50 Chromatographiesäulen (Pharmacia, Upsala, Schweden) nach Herstelleranweisung gereinigt, um überschüssige Primer, Nukleotide und Terminatoren zu entfernen. Die DNA wurde dann in 3 µl Formamid/EDTA (25 mM, pH 8,0) im Verhältnis 4:1 (v/v) aufgenommen. Das Sequenziergel wurde nach Herstelleranweisung gegossen. Es setzte sich wie folgt zusammen:

Gelzusammensetzung:

TBE-Puffer	1 x
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 30 %ige Lösung (BioRad, München)	5 %
Harnstoff	8,3 M

Zur Polymerisation wurden dem Gel TEMED und 10 % Ammoniak-Persulfat zugesetzt. Die Sequenzierungsproben wurden für 3 min bei 94°C denaturiert, dann für 2 min auf Eis gestellt und anschließend auf das Gel auftragen. Die Elektrophorese und Detektion erfolgte mit dem automatischen Sequenziergerät (Modell 373, PE Applied Biosystems, Weiterstadt). Die Elektrophoresedauer betrug 16 h bei 2500 V, 40 mA und 27 W. Die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente wurden in dem Polyacrylamidgel nach Größe getrennt. Die Fluoreszenz wurde durch einen Argonlaser angeregt und die sequenzspezifische Sekundärstrahlung durch einen Photomultiplier aufgezeichnet und computergestützt in ein Elektropherogramm umgewandelt.

5.5 Phylogenetische Analyse

Die erhaltenen Sequenzdaten konnten nun mit Sequenzdaten von Referenzorganismen verglichen und somit in phylogenetische Beziehung zu ihnen gesetzt werden.

5.5.1 Vorläufige Identifikation

Für einen ersten Vergleich der Sequenzdaten mit öffentlich verfügbaren Referenzdaten wurden die Sequenzdaten mit der Datenbank des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) verglichen. Das Ergebnis war eine Auflistung der nächstähnlichen Organismen unter Angabe eines Ähnlichkeitswertes (Homologiewertes) der in Prozent ausgedrückt wurde.

5.5.2 Erstellung phylogenetischer Stammbäume

Die Konstruktion mikrobieller Genealogien erfolgte mit Hilfe der Phylogenie-Software ARB, (entwickelt von O. Strunk und W. Ludwig, TU München; erhältlich über <http://www.biol.chemie.tu-muenchen.de/pub/ARB/> [Strunk und Ludwig, 1996]).

5.5.2.1. Erstellung von Protein-Stammbäumen

Zwecks Einrichtung eigener Datenbanken wurden DNA-Sequenzdaten für die Strukturgene *amoA*, *pmoA*, *mxoF* und *moxX* von der Datenbank "GenBank" (National Center of Biotechnology Information [NCBI], Benson *et al.*, 2000) bezogen. Die Datensätze umfaßten sowohl alle derzeit erhältlichen Sequenzen von MAB und AAOB als auch kultivierungsunabhängig erhobene Umweltsequenzen. Die Sequenzen wurden auf die Länge der relevanten Genabschnitte gekürzt und dann mit Hilfe des ARB-Datenbank-Systems in die Datenbank des ARBs eingegliedert. Mit diesen auf funktionellen Genen beruhenden Datenbanken war es nun möglich Proteinsequenzanalysen mit den von ARB bereitgestellten Phylogenieprogrammen durchzuführen. Nach der manuellen Zuordnung homologer Positionen („Alignment“) wurden die Nukleotidsequenzen in die jeweiligen Aminosäuresequenzen translatiert. Auf Basis dieser abgeleiteten Proteinsequenzen erfolgte die Berechnung der phylogenetischen Distanz. Hierfür wurde die Phylogenie-Software PHYLIP (Version 3.5C, Felsenstein 1989), die in ARB eingegliedert ist, verwendet. Mit Hilfe des Distanz-Matrix-Programms PROTDIST wurden evolutionäre Entfernungsdiagramme erstellt, wobei die Algorithmen von Dayhoff (1979) und Kimura (1983) als Grundlage für die Berechnung der Aminosäuresubstitutionen herangezogen wurden. Mit den Programmen FITCH und NEIGHBOR wurden die resultierenden Distanzwerte dann in einen phylogenetischen Stammbaum umgewandelt.

5.5.2.2 Erstellung von 16S rDNA-Stammbäumen

Die 16S rDNA-Sequenzdaten wurden zunächst den phylogenetisch nächsten Verwandten innerhalb der ARB-Datenbank, die ca. 14000 Referenzsequenzen umfaßt, zugeordnet. Dies

erfolgte mit den entsprechenden Funktionen des ARB-Programms in der Weise, daß anhand von Sekundärstrukturanalysen die jeweiligen homologen Positionen einander zugewiesen wurden („Alignment“; Maidak *et al.*, 1996; Van de Peer *et al.*, 1996; Ludwig, 1995). Eine solche Gegenüberstellung der erhobenen Sequenzdaten mit Referenzsequenzen ermöglichte auch einen Vergleich der hypervariablen Regionen der 16S rDNA (Gutell *et al.*, 1994). Im nächsten Schritt wurde das „Alignment“ aller homologen Positionen manuell überprüft und gegebenenfalls Lesefehler korrigiert. Solchermaßen aufgearbeitete Sequenzen wurden nun mit dem Verrechnungsmodell „Maximum Parsimony“ (Fitch, 1971) in einen aus 16S rDNA-Sequenzdaten erstellten Stammbaum eingebracht. Die Funktion „Maximum Parsimony“ in ARB bewirkt dabei, daß eingerechnete Sequenzen keinen Einfluß auf die Topologie des Stammbaumes haben. Für diese Berechnungen wurden auch keine evolutiven Korrekturfaktoren berücksichtigt. Der resultierende Stammbaum stellte daher eine nur annähernde Zuordnung der eingebrachten Umweltsequenzen zu den bekannten Organismen dar. Als „Gesamtbaum“ stellte er die Basis dar, auf der nun die geeigneten Referenzorganismen für weitergehende phylogenetische Analysen herangezogen wurden. Die in dieser Arbeit gezeigten 16 S rDNA-Stammbäume wurden mit dem Distanz-Matrix-Programm „Neighbor-Joining“ (Saitou und Nei, 1987) berechnet. Dieses Programm ist ein integraler Bestandteil in ARB, welcher auf Basis des entsprechenden PHYLIP-Programmes NEIGHBOR entwickelt wurde (Strunk und Ludwig, 1996). Die Umwandlung in eine Entfernungsmatrix wurde mit Hilfe des Algorithmus von Jukes und Cantor („Ein-Parameter-Modell“, 1969) durchgeführt. Um multiple Basensubstitutionen, welche zu einer Unterschätzung der tatsächlichen phylogenetischen Entfernung zweier Organismen führen können, zu berücksichtigen, wurde ein ebenfalls von Jukes und Cantor entwickelter Korrekturfaktor (1969) in die Berechnung miteinbezogen. Die paarweise Analyse aller Organismen resultierte in ein stammesgeschichtliches Entfernungsdiagramm, wobei die horizontalen Astlängen des Stammbaums die phylogenetische Entfernung der Organismen untereinander widerspiegelte. Für den phylogenetischen Vergleich war die Verwendung von Filtern (Masken) erforderlich, was bedeutet, daß nur konservierte Regionen, die eine eindeutige Zuordnung homologer Nukleotide gewährleisten, für die Verrechnung berücksichtigt wurden. Diese Maske wurde auf Basis der im ARB verfügbaren 16S rDNA-Sequenzen von α -Proteobakterien bzw. γ -Proteobakterien in der Weise konstruiert, daß nur Nukleotidpositionen mit mindestens 50% Invarianz in die phylogenetischen Analysen miteinbezogen wurden. 50% Invarianz bedeutet, daß durch die Wahl entsprechender Filter nur diejenigen Positionen berücksichtigt wurden, die in mindestens der Hälfte aller Sequenzen, auf denen die Filterberechnung beruht, das gleiche Nukleotid besitzen.

IV. Ergebnisse

Die Charakterisierung von Populationen an AAOB und MAB wurde mit unterschiedlichen PCR-Nachweissystemen durchgeführt. Die Analyse obiger Organismengruppen erfolgte zudem in unterschiedlichen Standorten, weshalb die Resultate getrennt dargestellt werden.

1. Ammoniak-Oxidierer (AAOB)

1.1 Ausbau der Sequenzdatenbank und phylogenetische Analyse auf Basis des *amoA*-Gens

amoA-Sequenzdaten von Reinkulturen und Gesamt-DNA aus Umweltproben

1. Reinkulturen

Genomische DNA von *Nitrosomonas halophila* Nm1, *Nitrosomonas nitrosa* Nm90 und *Nitrosospira* sp. L13 diente als Ausgangsmaterial, um Teilabschnitte des *amoA*-Gens mit den Primern *amoA*-1F und *amoA*-2R (Tab. 3) zu amplifizieren. Die generierten Amplikons mit einer Größe von 491 Bp konnten nach Aufreinigung direkt in die Sequenzierung eingesetzt werden. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden in die ARB-Datenbank integriert und phylogenetisch verrechnet (Abb. 1).

2. *amoA*-Klonsequenzen aus Gesamt-DNA von Umweltproben

Von der Süßwasser-Probe "TUK" (Tab. 2) wurden acht Klone sequenziert. Davon formten fünf Klone (TUK 3, 5, 7, 18 und 34) ein distinktes Cluster mit hoher Verwandtschaft zu *Nitrosomonas urea* (Abb. 1). Sequenztypen, mit hoher Verwandtschaft zu *Nitrosomonas urea*, wurden auch von Rotthauwe (1997) in den Proben vom Schöhsee nachgewiesen und von ihm als „Schöhsee“-Kluster bezeichnet. Drei Sequenzen (TUK 4, 23 und 27) bildeten zusammen mit dem Klon SP6 (Rotthauwe et al., 1997) ein distinktes Cluster, welches nahe zu *Nitrosomonas europaea* und *Nitrosococcus mobilis* gruppierte. Darüber hinaus fielen alle sieben sequenzierten Klone der Klärwerkprobe „ASK“ (ASK 2, 3, 4, 5, 10, 17, 76) in das „Schöhsee“-Cluster, waren also ebenfalls nah verwandt mit *Nitrosomonas urea*.

3. *amoA*-Klonsequenzen aus einer Anreicherung

Fünf ausgewählte Klone aus der Anreicherung der Ostsee-Probe „OST“ (Tab.2) waren sequenzidentisch und gruppierten um *Nitrosospira* sp. AHB1 und *Nitrosospira tenuis* Nv1.

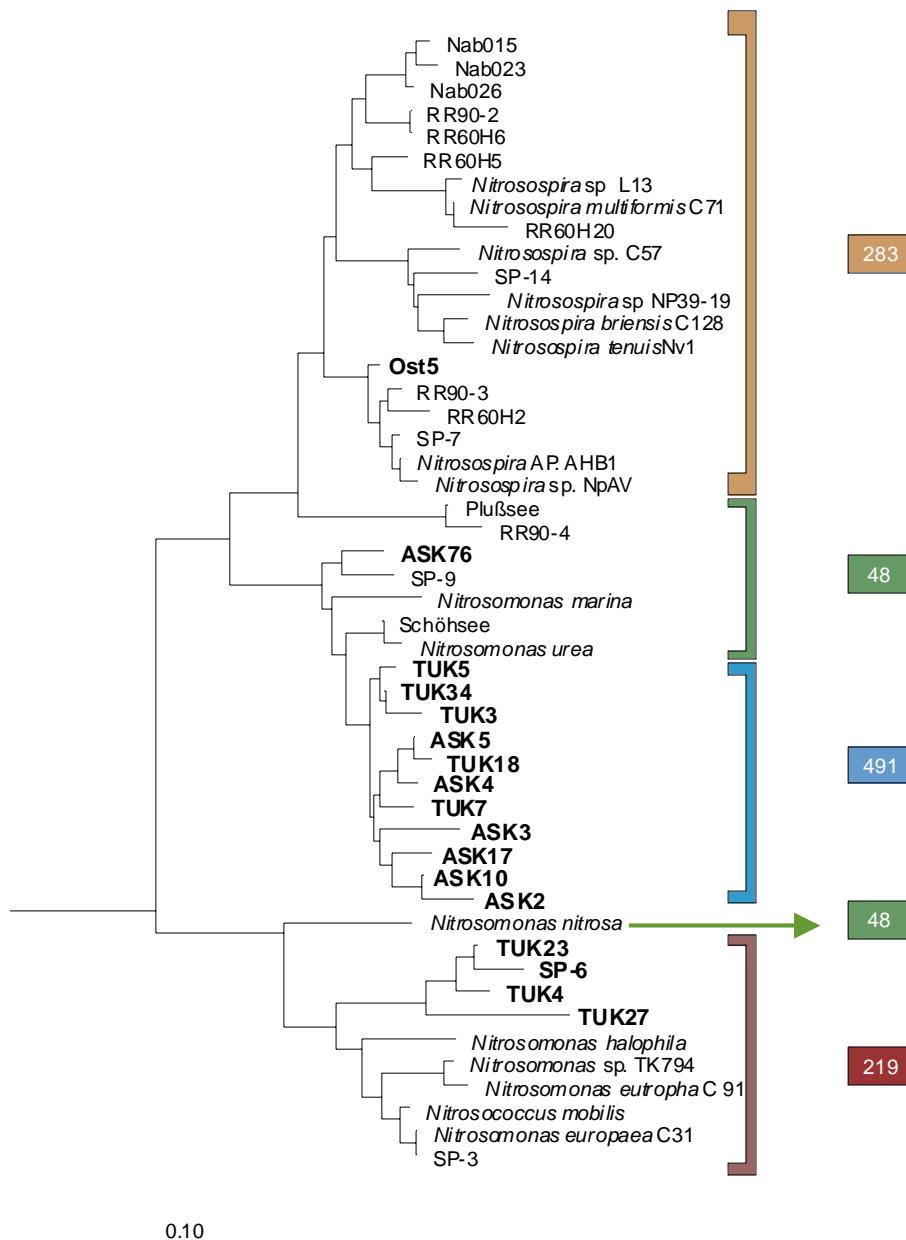


Abb.1: Evolutionäres Entfernungsdiagramm von *amoA*-Gensequenzen basierend auf 150 abgeleiteten Aminosäurepositionen. Der Algorithmus von Kimura (1983) wurde als Grundlage für die Berechnung der Aminosäuresubstitutionen herangezogen. Die Ermittlung der Stammbaumtopologie erfolgte unter Anwendung der Neighbor-Joining-Methode (Saitou & Nei, 1987). Das Dendrogramm zeigt die Positionen von Reinkulturen im Verhältnis zu Umweltklonen generiert von: 1. Wurzeln von 60 Tage und 90 Tage alten überfluteten Reispflanzen („RR60H“, „RR90“ [Rotthauwe, 1997]), 2. Belebtschlammbecken von zwei Klärwerken („SP“ [Rotthauwe, 1997], „ASK“), 3. See Plußsee („Plußsee“ [Rotthauwe, 1997]), 4. einem Teich „TUK“, 5. einem mit Metall belasteten Boden („Nab“ [Stephen *et al.*, 1999]), 6. Anreicherungskulturen, inokuliert mit Proben des Sees Schöhsee und Ostsee („Schöhsee“ [Rotthauwe, 1997]), „Ost“. Die in Fettdruck dargestellten Klonsequenzen wurden in dieser Arbeit ermittelt. Die Zahlen zeigen die Größe von gruppenspezifischen T-RFs der *TaqI*-basierenden T-RFLP-Analyse an. Der Entfernungsmaßstab entspricht zehn kalkulierten Aminosäuresubstitutionen pro 100 Aminosäurepositionen. Die Proteinsequenz der homologen *pmoA* von *Methylococcus capsulatus* wurde benutzt, um die Wurzel des Dendrogramms zu bestimmen.

1.2 T-RFLP-Analyse von *amoA*-Genen

Theoretische Ableitung von Schnittstellen mit Hilfe der *amoA*-Datenbank

Auf der Basis des Strukturgens *amoA* wurden in einer vorangegangenen Untersuchung (Rotthauwe, 1997) erste T-RFLP-Analysen durchgeführt. Ein systematischer Überblick über verschiedene natürliche Habitate bzw. eine exakte Korrelation zu phylogenetisch definierten Gruppen an AAOB lag jedoch noch nicht vor. Der vorliegende Untersuchungsteil diene daher der methodologischen Evaluierung der Anwendbarkeit der T-RFLP-Analyse auf Basis des funktionellen Gens *amoA*.

Für die T-RFLP-Analysen von *amoA*-Genen wurde primär das Restriktionsenzym *TaqI* verwendet. Der Vergleich mit der *amoA*-Sequenzdatenbank zeigte, daß eine Schnittstelle an der Position 283 hochspezifisch für die phylogenetisch kohärente Gruppe der *Nitrospira* spp. ist. Dagegen zeigten *Nitrosomonas europaea*-verwandte Sequenzen, welche die Organismen *Nitrosomonas eutropha*, *Nitrosococcus mobilis* und *Nitrosomonas halophila* umfaßten, eine spezifische Schnittstelle bei Position 219. Eine Schnittstelle bei 48 Bp war zugleich für mehrere Entwicklungslinien charakteristisch: für *Nitrosomonas nitrosa*, *Nitrosomonas marina*, *Nitrosomonas urea* (incl. der „Schöhsee“-Linie) und der „Plußsee“-Linie (Rotthauwe *et al.*, 1997). Die Untergruppe der „Schöhsee“-Linie, welche durch die in dieser Arbeit gefundenen Klonsequenzen charakterisiert wurde, besaß keine *TaqI* Schnittstelle, so daß die T-RFLP-Analyse ein Fragment von 491 bp (= Gesamtgröße des Amplikons) hervorbringen sollte.

Die theoretische Ableitung obiger Schnittstellen wurde nun in einem Vorversuch an Reinkulturen und Umweltklonen getestet. Sowohl für die Reinkulturen als auch für die Klone entstanden jeweils einzelne, definierte T-RFs, welche mit einer Varianz von \pm einer Base mit den aus der Datenbank vorhergesagten Fragmentgrößen übereinstimmten. Dieser Versuch zeigte, daß die klonierungsunabhängige T-RFLP-Analyse auf der Basis von *amoA* das Potential besitzt, definierte Untergruppen an AAOB innerhalb der β -*Proteobacteria* in Umwelt-PCR-Produkten zu identifizieren.

Die entsprechende Zuordnung der vier spezifischen T-RFs zu den jeweiligen Organismengruppen ist in Abb. 1 durch die am Rande des Stammbaumes angegebenen Zahlen angezeigt.

Der Nachweis von AAOB in verschiedenen Umwelten mittels T-RFLP-Analyse

Die Anwendung der T-RFLP-Technik auf verschiedene Umweltproben führte zum Nachweis spezifischer Fragmentmuster (Abb. 2). Die Korrelation von den T-RFLP-Profilen mit klonierten *amoA*-Sequenzen erlaubte die Zuordnung der T-RFs zu definierten Gruppen an AAOB. Die Süßwasserprobe „TUK“ bestand aus *Nitrosomonas europaea*-verwandte *amoA*-

Sequenzen (219 Bp) und Sequenzen, die zu dem „Schöhsee“-Kluster (491-Bp) zugeordnet werden konnten. Die Probe des Belebtschlammbeckens „ASK“ war durch die T-RFs der Größe 48 Bp und 491 Bp gekennzeichnet. Diese beiden T-RFs wiesen auf das Vorhandensein von Sequenztypen des „Schöhsee“-Cluster hin. An der Reisswurzel wurde neben dem 48 Bp-Fragment das für *Nitrosospira* spp. spezifische T-RF von 283 Bp nachgewiesen.

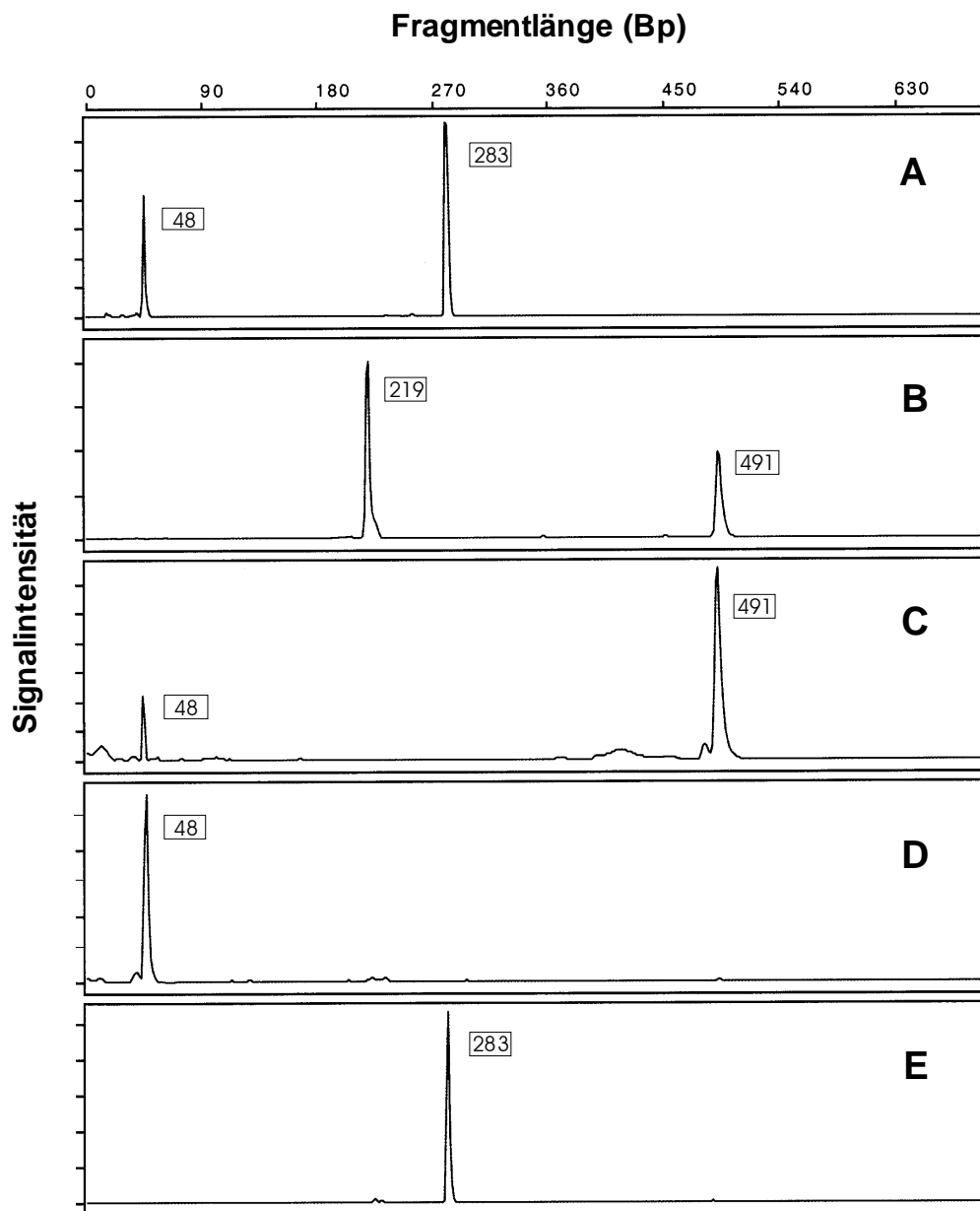


Abb. 2: Vergleichende T-RFLP-Analyse von *TaqI*-verdauten *amoA*-PCR-Produkten erzielt von drei verschiedenen Umwelten: A) Reisswurzel „RR 90“ B) Süßwasserprobe „TUK“, C) Belebtschlammbecken „ASK“ und von zwei Anreicherungsproben: D) „Schöhsee“ und E) Ostsee „OST“

Die Anreicherungsprobe aus dem Schöhsee zeigte das T-RF von 48 Bp und bestätigte somit den Befund von Rotthauwe (1997), welcher durch vergleichende Sequenzanalyse das gleichnamig genannte „Schöhsee“-Kluster detektierte. In Übereinstimmung mit der Sequenzanalyse konnte in der Anreicherungsprobe „Ost“ hingegen nur das für *Nitrosospira* spp. charakteristische 283-Bp T-RF nachgewiesen werden.

Relative Amplifikationseffizienz von *amoA* für *Nitrosomonas europaea* und *Nitrosomonas tenuis*

Mit der T-RFLP-Methode werden nicht nur T-RFs identifiziert, sondern auch deren relativen Anteile im Vergleich zur Gesamtheit aller T-RF-Signale innerhalb eines PCR-Produktes bestimmt. Es stellte sich aber die Frage, inwieweit Aussagen über die relative Abundanz definierter Sequenztypen in der Ausgangsprobe (d. h. vor der PCR-Amplifikation) gemacht werden können. Anhand folgenden Modellversuchs wurde dieser Frage nachgegangen, indem die Amplifikationseffizienz zweier im Gemisch vorliegender *amoA*-Sequenztypen getestet wurde. Genomische DNA von *Nitrosomonas europaea* (219-Bp T-RF) und *Nitrosospira tenuis* (283-Bp T-RF) wurden in definierten Mengenverhältnissen miteinander gemischt und nachfolgend amplifiziert. Mittels T-RFLP-Analyse wurden die relativen Abundanzen der beiden T-RFs (219 Bp versus 283 Bp) bestimmt. Der Versuch zeigte, daß die Anteile der beiden T-RFs weitestgehend die zuvor in die PCR eingesetzten Mengenverhältnisse widerspiegelte (Tab. 6). Mengenverhältnisse von 1:100 führten jedoch dazu, daß die nur zu einem Hundertstel eingesetzte DNA-Komponente nicht mehr detektiert wurde.

Dieses Modellexperiment schlägt am Beispiel zweier repräsentativer Vertreter der beiden T-RFs der Größe von 219 Bp und 283 Bp vor, daß eine Amplifikation mit vergleichbarer Effizienz stattfindet, sofern die relativen Abundanzen im Bereich von 5% bis 100% vorliegen.

Tabelle 6: Ergebnis der relativen Prozentanteile an *amoA*-Sequenzen von *Nitrosospira tenuis* und *Nitrosomonas europaea* mit definierten Mischungsverhältnissen an genomischer DNA. Die Prozentzahlen beziehen sich auf die relativen Abundanzen der 283-Bp (*Nitrosospira* sp.) und 219-Bp (*Nitrosomonas* sp.) großen T-RFs in der auf *TaqI*-basierenden T-RFLP-Analyse. Das Ergebnis repräsentiert den Mittelwert aus drei unabhängig durchgeführten PCR- und T-RFLP-Experimenten. Die unteren Zahlen geben die Standardabweichung an.

Testorganismen	Mischungsverhältnisse der Ziel-DNA						
<i>Nitrosomonas europaea</i>	1	1	1	1	1:5	1:20	1:100
<i>Nitrosospira tenuis</i>	1:100	1:20	1:5	1	1	1	1
<i>Nitrosomonas europaea</i>	100 %	93 % +/- 1	69 % +/- 1,2	56 % +/- 4,6	31 % +/- 7,5	6 % +/- 1	0 %
<i>Nitrosospira tenuis</i>	0 %	7 % +/- 1	31 % +/- 1,2	44 % +/- 4,6	69 % +/- 7,5	94 % +/- 1	100 %

1.3 Relative Abundanz von definierten Gruppen an AAOB in unterschiedlichen Umwelten

Tabelle 7 zeigt die relativen Anteile der einzelnen phylogenetischen Gruppen an AAOB im Vergleich. Mit der auf *amoA* basierenden T-RFLP-Analyse konnten Vertreter der Gattung *Nitrosospira* (283-Bp T-RF) als dominante Populationen in den Reiswurzelp Proben und in der Anreicherungsprobe aus der Ostsee nachgewiesen werden. *Nitrosomonas europaea*-verwandte Organismen (219-Bp T-RF) machten den größten Anteil in der Süßwasserprobe „TUK“ und dem Belebtschlammbecken „SP“ aus. Im Gegensatz dazu enthielt die Süßwasserprobe „Plußsee“ ausschließlich AAOB, die in die gleichnamig genannte *amoA*-Entwicklungslinie fiel (48-Bp T-RF). Die „Schöhsee“-Probe wiederum bestand ausschließlich aus *Nitrosomonas urea*-ähnlichen Organismen (ebenfalls T-RF 48). Vertreter dieser Gruppe waren auch als einzige in dem Belebtschlammbecken „ASK“ vorzufinden (T-RF 48 und 491). Die größte Heterogenität zeigte die Klärwerksprobe „SP“, in der Sequenztypen detektiert wurden, welche zu *Nitrosomonas urea*, zu *Nitrosomonas europaea* oder zu *Nitrosospira* spp. zugeordnet werden konnten.

Tabelle 7:

Zusammenfassung der auf *TaqI*-basierenden T-RFLP-Analysen von *amoA*-Genen aus verschiedenen Umwelten. Die Zahlen zeigen den relativen Anteil jedes einzelnen T-RFs in Prozent an und beziehen sich auf die Gesamtfluoreszenzintensitäten aller T-RFs in den entsprechenden *amoA*-PCR-Produkten. Die Quantifizierung erfolgte automatisch anhand der Peakflächen mit der GeneScan Software (PE Applied Biosystems). Die Abkürzungen beziehen sich auf definierte Untergruppen an AOB, die mittels vergleichender Sequenzanalyse klonierter *amoA*-Gene detektiert worden waren. (P = „Plußsee“, S1 = „Schöhsee“, NmN = *Nitrosomonas nitrosa*, Nm = *Nitrosomonas*-Cluster, Nsp = *Nitrosospira*-Cluster, S2 = Sub-Cluster der „Schöhsee“-Linie). Die Tabelle schließt die von Rotthauwe (1997) analysierten Proben (*) mit ein.

Umweltproben			T-RFs (Fragmentlänge in [Bp])					
	Herkunft	Name	48 Bp			219 Bp	283 Bp	491 Bp
			P	S1	NmN	Nm	Nsp	S2
nicht angereichert	Reiswurzel	RR60H*					100	
		RR90	22				78	
	Süßwasser	Plußsee*	100					
		TUK				59		41
	Klärwerk	SP*		8		71	21	
		ASK		6				94
angereichert	Süßwasser	Schöhsee		100				
	Ostsee	OST					100	

2. Methanotrophe (MAB) an der Reisswurzel

Die Anwendung der unterschiedlichen PCR-Systeme, welche spezifisch Teilabschnitte der Gene *pmoA* (pMMO), *mmoX* (sMMO), *mxoF* (MDH), und 16S rDNA der MAB innerhalb der *γ-Proteobacteria* (Typ-I-MAB) erfassen sollten, resultierte in Amplikons mit den in Tab. 3 angegebenen Fragmentgrößen. Mit den PCR-Produkten wurden Klonbibliotheken erstellt und zufällig ausgewählte Klone nachfolgend für die vergleichende Sequenzanalyse eingesetzt.

2.1. Etablierung der T-RFLP-Analyse auf Basis von „*PmoA*“

Zunächst wurden Endonukleasen theoretisch auf ihre Eignung hin untersucht, die genetische Diversität methanotropher Lebensgemeinschaften mit Hilfe eines einzelnen elektrophoretischen Profils darzustellen. Die Positionen der mutmaßlichen Schnittstellen wurden mit den entsprechenden Funktionen des ARB-Programms für alle Sequenzen angezeigt. Dies umfaßte *pmoA*-Sequenzen von 24 Reinkulturen und 78 Umweltklonen. Restriktionsenzyme mit einem Sequenzerkennungsmotiv von mehr als 4 Basen kamen nicht in Betracht, da die jeweiligen Schnittstellen zu selten vorkommen. Ein Großteil der tetrameren Restriktionsenzyme konnten ebenfalls ausgeschlossen werden, da sie T-RFs erzeugten, die keine klare Zuordnung zu distinkten Gruppen an MAB erlaubten. Die tetrameren Restriktionsenzyme *MspI* und *Hsp92* wurden zunächst für erste *pmoA*-T-RFLP-Versuche ausgewählt. Um die aus den Sequenzinformationen theoretisch abgeleiteten Schnittstellen experimentell zu belegen, wurden einzelne *pmoA*-Klone und Reinkulturen getestet. Zusätzlich wurden gleiche Mengen an genomischer DNA von *Methylococcus capsulatus* und *Methylosinus trichosporium* gemischt und gemeinsam analysiert. Das Experiment mit dem Enzym *MspI* führte zu T-RFs, die mit den theoretisch ermittelten Schnittstellen aus der *pmoA*-Sequenz-Datenbank \pm einer Nukleotidposition übereinstimmten (Abb. 3A bis E). Im Gegensatz dazu erwies sich *Hsp92* für die *pmoA*-T-RFLP-Analyse nur bedingt tauglich, da die Schnittstellen für *Methylococcus capsulatus* (388-Bp T-RF) und *Methylosinus trichosporium* (392-Bp T-RF für alle Typ-II-MAB) zu nahe beieinander lagen (Abb. 3F). Das Enzym *MspI* erwies sich somit für die Erstellung verlässlicher und umweltspezifischer T-RF-Muster am meisten geeignet. *Hsp92* wurde für weitere Experimente nicht mehr verwendet.

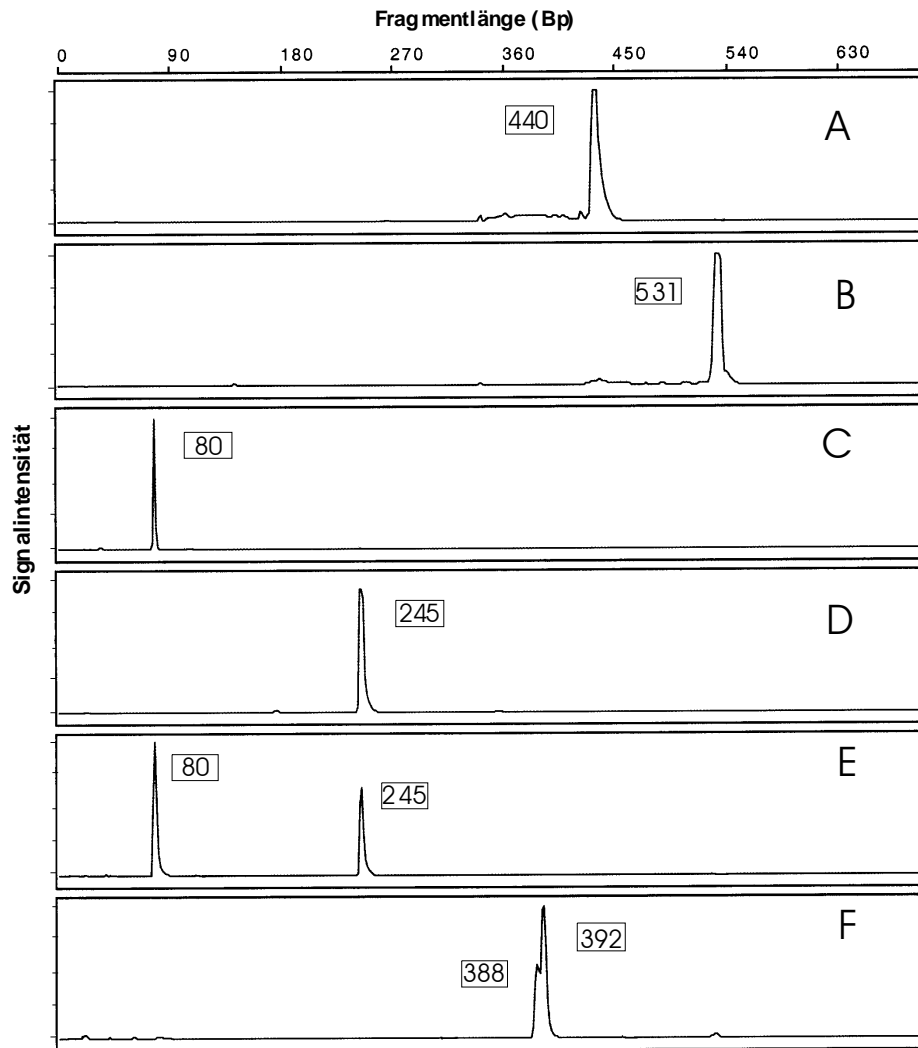


Abb. 3: Vergleichende T-RFLP-Analyse von *MspI* verdauten *pmoA*-PCR-Produkten (A bis D) von Reinkulturen und Klonen: A) *Methylomonas methanica*, B) Klon M84-P34 (*pmoA*-Cluster II), C) *Methylococcus capsulatus* D) M84-P2 (Typ-II-MAB); E und F) Gemisch der beiden Reinkulturen *Methylococcus capsulatus* und *Methylosinus trichosporium* mit E) *MspI* und F) *Hsp92* geschnitten.

2.2. Detektion von Umweltsequenzen, Ausbau der „*pmoA*“-Datenbank

Die Mehrheit der 47 analysierten Klone erzielt von Wurzel-DNA (Reis-Mikrokosmen M84 und M90) formten drei distinkte Cluster innerhalb der Typ-I-MOB (Abb. 4A). 16 Klone (*pmoA*-Cluster I) gruppierten eng mit *Methylomonas methanica*. *PmoA*-Cluster II (10 Klonsequenzen) formte eine separate Entwicklungslinie, welche am nächsten zur *pmoA* von *Methylomicrobium album* und *Methylomonas methanica* gruppierte. *PmoA*-Cluster III war charakterisiert durch 10 Klone mit moderater Verwandtschaft zu *Methylococcus capsulatus*. Nur zwei *pmoA*-Klone wurden den Typ-II-MAB (*Methylosinus/Methylocystis*) zugeordnet. Vier Klone fielen in die *Nitrosospora*-Gruppe der AOB. Sie repräsentierten somit

Sequenztypen des zu *pmoA* homologen *amoA*-Gens. 5 Klonsequenzen bildeten die Linien A, B und C, welche weder den MAB noch AAOB zugeordnet werden konnten. Während Sequenztypen von Typ-II-MAB, Linie A und Linie C ausschließlich aus Probe M84 stammten, wurden die *pmoA*-Cluster I - III, Linie B und AAOB sowohl in den Proben M84 als auch M90 detektiert.

Abb 4: Evolutionäres Entfernungsdiagramm (A) von *pmoA*- und *amoA*- Sequenzen basierend auf 165 abgeleiteten Aminosäurepositionen im Vergleich zu T-RFLP-Profilen (B) und DGGE-Profilen (C) auf Basis von *pmoA*. Die genetischen "Fingerprints" (T-RFLP- und DGGE-Analyse) und ein Großteil der Klonsequenzen wurden von Reiswurzeln desselben Mikrokosmoses (M84) erzeugt. **A:** Der Algorithmus von Kimura (1983) wurde als Grundlage für die Berechnung der Aminosäuresubstitutionen herangezogen. Die Ermittlung der Stammbaumtopologie erfolgte unter Anwendung der Neighbor-Joining-Methode (Saitou und Nei, 1987). Das Dendrogramm zeigt *pmoA*- und *amoA*- Umweltklone (+ Gensequenzen von anderen mutmaßlichen Monooxygenasen) generiert von Wurzeln überfluteter Reispflanzen der Mikrokosmen M84 und M90 in Relation zu Reinkulturen von MAB und AAOB und weiteren Umweltsequenzen. Folgende Umweltsequenzen von *pmoA* wurden als Referenzen mit einbezogen: „RA14“, „RA21“, „Rold1“, „Rold4“ und „Rold5“ (Laubwald in Dänemark), „Pantanal13“ (Regenwald in Brasilien), „Maine6“ und „Maine9“ (Mischwald in den USA) [Holmes *et al.*, 1999], „DGGE-MR2“, und „MR1“ (Laubwald in der Nähe von Marburg, Deutschland [Henckel *et al.*, 2000]), „He-I“ bis „He-IV“ und „He-VI“ (inkubierter Reisfeldboden [Henckel *et al.*, 1999]), „PE9“ und „PD2“ (Torfmoor in England [McDonald und Murrell 1997]). Die Nummern I bis III kennzeichnen die drei distinkten *pmoA*-Cluster von Typ-I-MAB, die in den Reiswurzelp Proben nachgewiesen wurden. Der Entfernungsmaßstab entspricht zehn kalkulierten Aminosäuresubstitutionen pro 100 Aminosäurepositionen. **B:** T-RFLP-Analyse eines *MspI*-verdauten *pmoA*-PCR-Produktes von Probe M84. Die Zahlen in den farbigen Kästchen geben die Größe der T-RFs in Bp an, welche phylogenetisch definierten Gruppen an MAB oder AAOB zugeordnet werden konnten (siehe auch farbige Pfeile). **C:** DGGE-Profil eines *pmoA*-PCR-Produktes generiert aus der Probe M84. Für eine vergleichende Sequenzanalyse wurden die vier dominanten DGGE-Banden ausgeschnitten, reamplifiziert und über DGGE-Analyse reanalysiert, um die elektrophoretische Mobilität der ausgeschnittenen Banden zu verifizieren. Die Zuordnung der DGGE-Banden zu distinkten *pmoA*-Cluster ist in (C) angezeigt (im Dendrogramm (A) nicht mit eingerechnet).

Abb. 4 A bis C

2.3 T-RFLP-Analyse von *pmoA*-Genen an Reiswurzel

Um die Reproduzierbarkeit der T-RFLP-Technik für ihre Anwendung in Umweltanalysen zu überprüfen, wurden von einer Wurzelprobe drei unabhängig generierte *pmoA*-Amplikons getestet. Alle drei Replikate zeigten das gleiche Profil von definierten T-RFs mit definierten Fragmentgrößen. Die Korrelation zwischen den erzeugten T-RFLP-Profilen und klonierten *pmoA*-Sequenzen erlaubte die klare Zuordnung der T-RFs zu distinkten Gruppen von MAB (Abb. 4A und B). Folgende T-RFs konnten identifiziert werden: ein 80-Bp T-RF zeigte das Vorkommen von *pmoA*-Cluster III. Dieses T-RF war zugleich für *Methylococcus capsulatus* und *Methylocaldum* spp charakteristisch, welche im *pmoA*-Stammbaum eine distinktes Cluster bilden. Ein 245-Bp T-RF war spezifisch für alle derzeit bekannten *pmoA*-Gene von Typ-II-MAB (*Methylosinus* und *Methylocystis* spp.). Ein 350-Bp T-RF indizierte *Methylomicrobium album*. Hierzu korrelierende Sequenztypen wurden in den Klonbibliotheken jedoch nicht gefunden. Ein 440-Bp T-RF war spezifisch für *PmoA*-Cluster I incl. *Methylomonas methanica*. Ein T-RF von 505 Bp deutete auf *Methylobacter* sp. BB5.1 hin, für das ebenfalls keine Klonsequenz über „*pmoA*“ nachgewiesen wurden. Die Sequenztypen, die das *pmoA*-Cluster II beschreiben, besaßen kein Erkennungsmotiv für *MspI*. Sie korrelierten also mit dem 531 Bp-Fragment, welches die Gesamtgröße des *pmoA*-Amplikons ausmachte. Zusätzlich zu diesen von der Peakfläche abundanten T-RFs waren eine Reihe von T-RFs mit geringerer Signalintensität zu sehen, von denen vier mit Sequenzinformation belegt werden konnten (Linie A [280 Bp], Linie B [228 Bp] und Linie C [113 Bp]). Das 47-Bp T-RF deutete auf die homologe *amoA* der *Nitrosospiral/Nitrosomonas*-Gruppe hin.

2.4. DGGE-Analyse von *pmoA*-Genen an Reiswurzel

Ergänzend wurde eine DGGE-Analyse auf Basis von *pmoA*-Amplikons mit der gleichen Umweltprobe (M84) durchgeführt. Dies ergab in drei unabhängigen Ansätzen vier dominante DGGE-Banden, welche durch Sequenzanalyse als *pmoA*-Gene identifiziert werden konnten (Abb. 4C). Zwei DGGE-Banden gruppieren in das *pmoA*-Cluster III, zwei weitere DGGE-Banden fielen in die Typ-II-MAB. *pmoA*-Cluster I und II, AAOB sowie die Linien A, B und C wurden über diese „Fingerprinting“-Technik nicht detektiert.

2.5. *pmoA*-T-RFLP-Analyse von verschiedenen Mikrokosmen im Vergleich

Die T-RFLP-Analyse mit Wurzelproben aus den verschiedenen Mikrokosmen (M70, M84 und M90) zeigte übereinstimmende Profile und bestätigte somit die Präsenz der gleichen Gruppen an MAB. Zu Vergleichszwecken wurde undurchgewurzelter Boden in die T-RFLP-Analyse miteinbezogen (Abb. 5A). Der Vergleich zwischen den Wurzelproben der einzelnen Mikrokosmen (Abb. 5B bis D) zeigt, daß die relativen Anteile der T-RFs für *pmoA*-Cluster I

(440 Bp), für *Methylobacter* sp. BB5.1 (505 Bp) und für *pmoA*-Cluster II (531 Bp) im Vergleich zur Gesamtsignalstärke der jeweiligen Proben unterschiedlich sind. Das Verhältnis zwischen dem *pmoA*-Cluster III (80-Bp T-RF) und Typ-II-MAB (245-Bp T-RF) bleibt hingegen weitgehend konstant. Diese beiden T-RFs machen auch den Hauptanteil in allen untersuchten Wurzelproben aus. Der Vergleich der methanotrophen Populationen zwischen Reisfeldboden und Reiswurzeln (Abb. 5A) zeigte demnach deutliche Unterschiede hinsichtlich der Besiedlung der Habitate mit Typ-I-MAB.

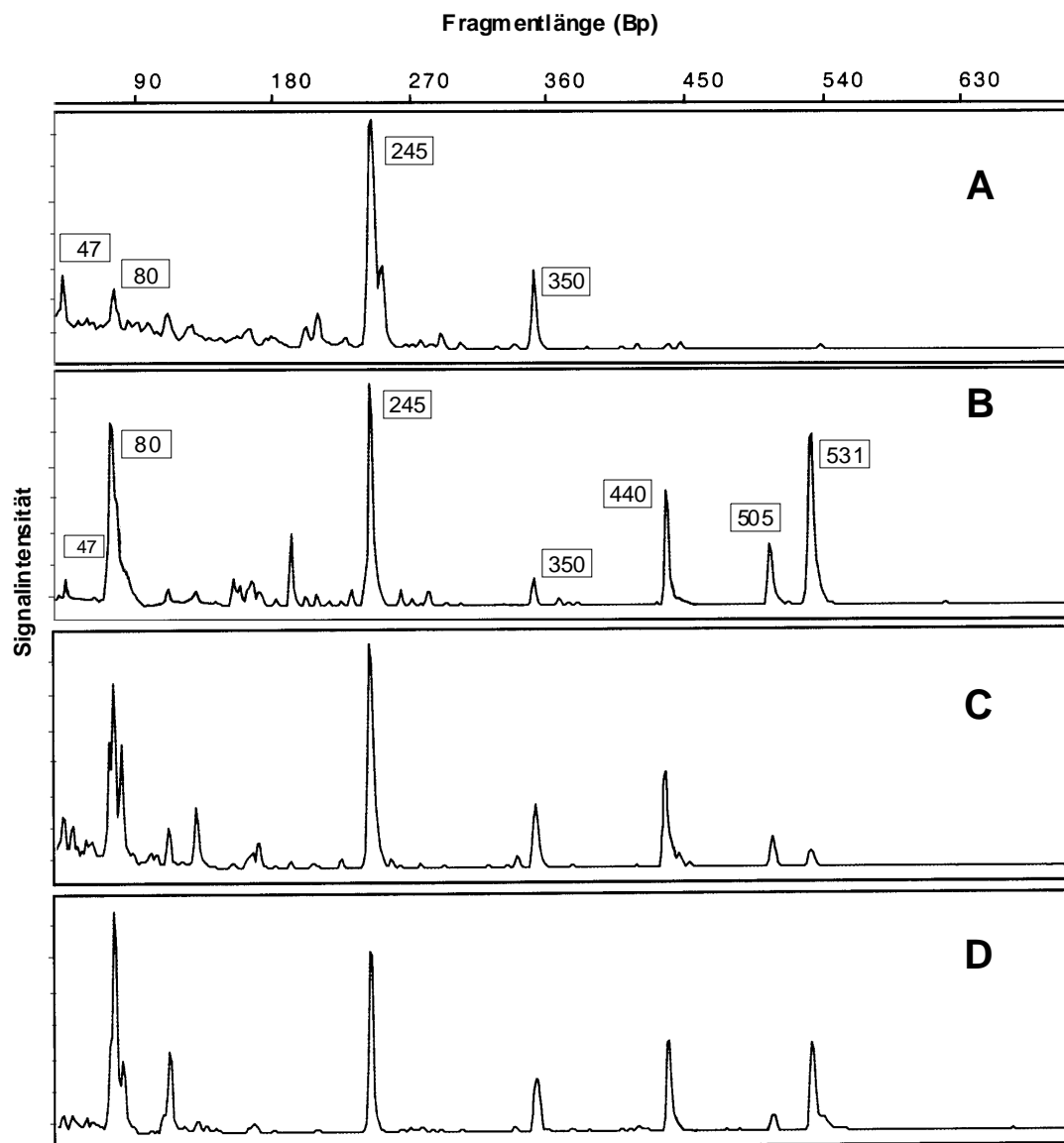


Abb. 5: Vergleichende T-RFLP-Analyse von *MspI* geschnittenen *pmoA*-PCR-Produkten. Gezeigt sind die methanotrophen Populationen eines undurchwurzelter Bodens (A) und von Reiswurzeln der Reismikrokosmen M84 (B), M90 (C) und M70 (D). Die T-RFs, welche eindeutig zu distinkten Gruppen von MAB oder AAOB korrespondieren, sind in A und B repräsentativ mit Zahlen gekennzeichnet.

Während Typ-II-MAB in allen Proben dominant vorhanden sind, findet man in der Bodenprobe nur relative geringe Anteile der Typ-I charakterisierenden T-RFs (80 Bp und 350 Bp). Die T-RFs mit 440, 505 und 531 Bp waren in der Bodenprobe nicht nachweisbar. Dies schlägt eine höhere Diversität von Typ-I-MAB an der Wurzel gegenüber dem Boden vor.

2.6. Nachweissystem „*mmoX*“

Fünf von fünfzehn analysierten *mmoX*-Klonen, welche aus extrahierter DNA der Reis-Mikrokosmen M84 und M90 stammten, gruppierten zusammen mit dem Typ-II-Isolat LR1 (Abb. 6). Dieser Organismus wurde aus einem organischen Boden in Ottawa (Kanada) isoliert und ist in der Lage, atmosphärisches Methan zu oxidieren (Dunfield *et al.*, 1999). Drei Klonsequenzen gruppierten zusammen mit *Methylocystis* sp. M. Darüberhinaus zeigte Klonsequenz M84-S38 eine nur moderate Verwandtschaft zu dem acidophilen MAB *Methylocella palustris* (Dedysh *et al.*, 1998). Die Ähnlichkeit dieser beiden *mmoX*-Genabschnitte beträgt auf der Ebene der Proteinsequenz 84 %. Die verbleibenden 6 Klone enthielten kein *mmoX*-Genfragment.

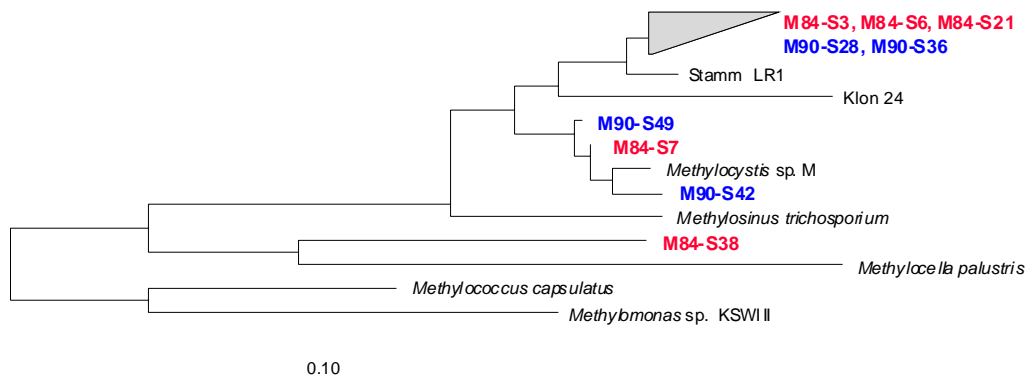


Abb.6: Evolutionäres Entfernungsdiagramm von *mmoX*-Gensequenzen basierend auf 286 abgeleiteten Aminosäurepositionen. Der Algorithmus von Kimura (1983) wurde als Grundlage für die Berechnung der Aminosäuresubstitutionen herangezogen. Die Ermittlung der Stammbaumtopologie erfolgte unter Anwendung der Neighbor-Joining-Methode (Saitou und Nei, 1987). Das Dendrogramm zeigt die Positionen von Reinkulturen im Verhältnis zu Umweltklonen generiert von Wurzeln überfluteter Reispflanzen der Mikrokosmen M84 und M90 und von einem sauren Torfmoor (Klon 24 [Dedysh *et al.*, 1998]). Der Entfernungsmaßstab entspricht zehn kalkulierten Aminosäuresubstitutionen pro 100 Aminosäurepositionen.

2.7. Nachweissystem „*mxoF*“

24 von 50 untersuchten Klonsequenzen gruppieren mit *Methylomonas methanica* und *Methylophobium album* (Abb. 7). Eine Klonsequenz gruppierte mit dem *Methylococcus*-ähnlichen Organismus LK6, und nur ein Klon wurde detektiert, der in die Gruppe der Typ-II-Organismen (Verwandtschaft zu Stamm LR1) fiel. Eine weitere Klonsequenz gruppierte nahe zu *Hyphomicrobium* sp. CM2 (nicht in Abb. 7 gezeigt). Die verbleibenden 23 Klone enthielten kein *mxoF*-Genfragment.

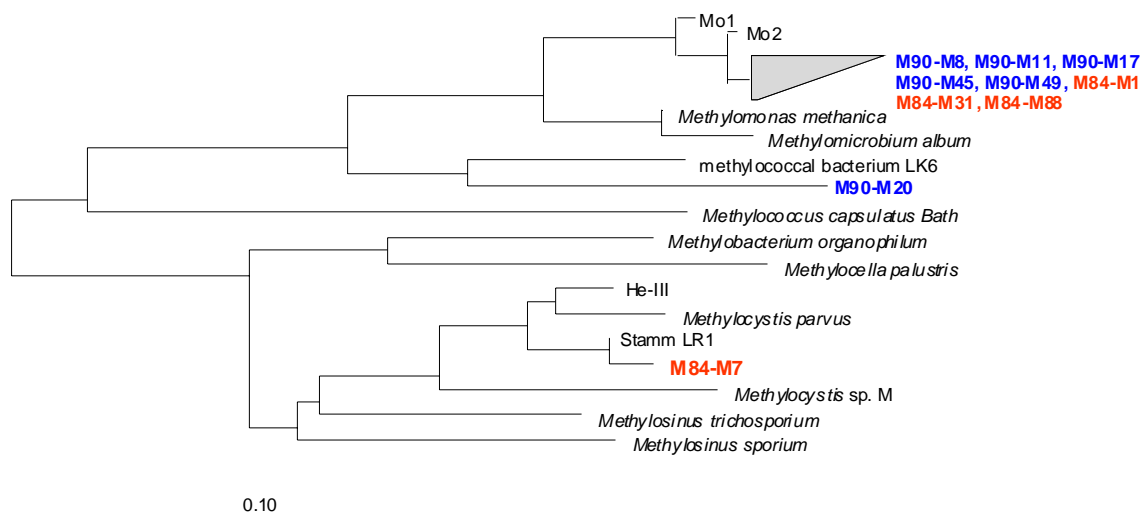


Abb.7: Evolutionäres Entfernungendiagramm von *mxoF*-Gensequenzen basierend auf 172 abgeleiteten Aminosäurepositionen. Der Algorithmus von Kimura (1983) wurde als Grundlage für die Berechnung der Aminosäuresubstitutionen herangezogen. Die Ermittlung der Stammbaumtopologie erfolgte unter Anwendung der Neighbor-Joining-Methode (Saitou und Nei, 1987). Das Dendrogramm zeigt die Positionen von Reinkulturen im Verhältnis zu Umweltklonen generiert von Wurzeln überfluteter Reispflanzen der Mikrokosmen M84 und M90, von inkubiertem Reisfeldboden („He-III“ [Henckel *et al.*, 1999] und „Mo1“ und „Mo2“ [Henckel *et al.*, 2000]). Der Entfernungsmaßstab entspricht zehn kalkulierten Aminosäuresubstitutionen pro 100 Aminosäurepositionen.

2.8. Nachweissysteme auf Basis von 16S rDNA („MethT1A“ und „MethT1B“)

Da mit dem Detektionssystem „*pmoA*“ (Sequenz- und T-RFLP-Analysen) eine hohe Diversität von Typ-I-MAB an den Reiswurzeln nachgewiesen werden konnte, sollte diese Gruppe im folgenden auf Basis von 16S rDNA bzw. 16S rRNA eingehender analysiert werden. Von allen drei Mikrokosmen (M70, M84 und M90) wurden 16S rDNA-Klonbibliotheken generiert. Die Extraktion von Gesamt-RNA und die nachfolgende *in vitro*-Synthese von rcDNA wurde jedoch nur mit frisch geernteten Reiswurzeln des Mikrokosmos M70 durchgeführt. Es kamen zwei unterschiedliche 3'-Primer zum Einsatz, da die reverse

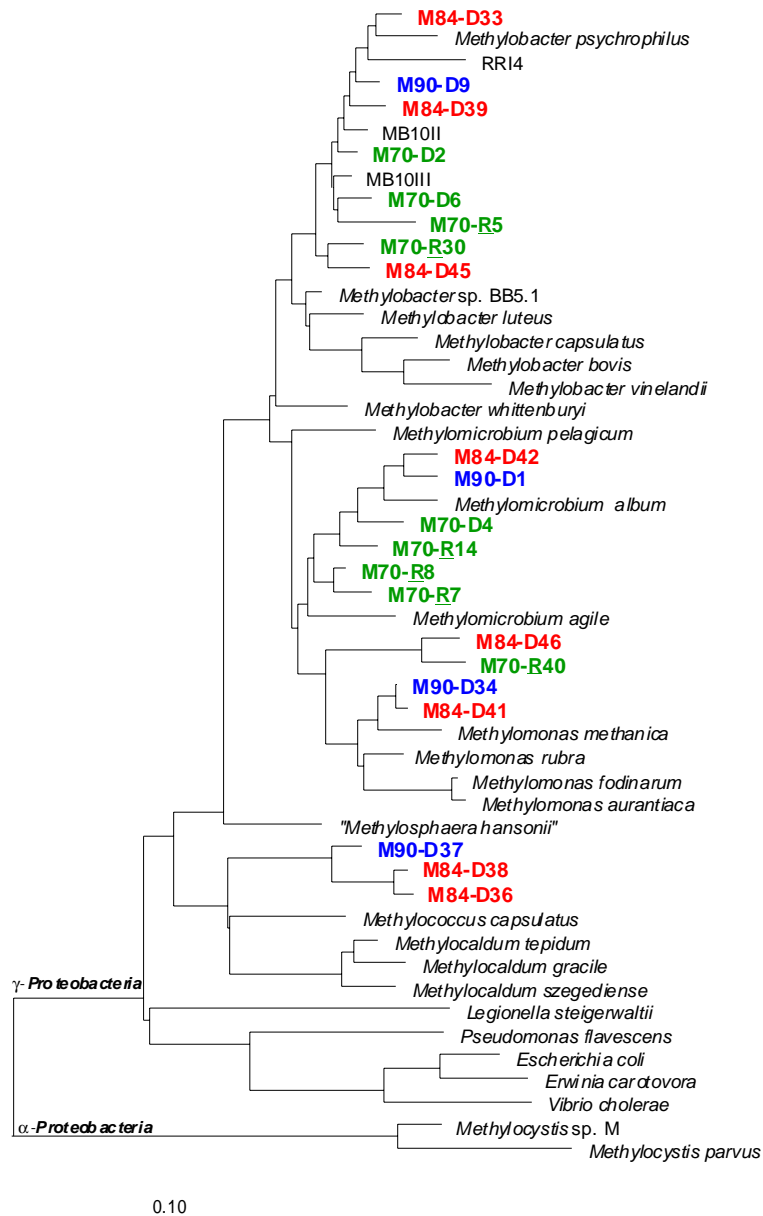


Abb.8: Evolutionäres Entfernungsdiagramm von 16S rDNA/rRNA-Klonsequenzen von Wurzeln überfluteter Reispflanzen der Mikrokosmen M84, M90 und M70 im Vergleich zu 16S rDNA-Sequenzen von Typ-I-MAB innerhalb der γ -Proteobacteria und anderen Umweltsequenzen: von inkubiertem Reisfeldboden („MB10II“, „MB10III“ [Henckel *et al.*, 1999] und Rhizosphäreboden von Reismikrokosmen („RRI4“ [Bodelier *et al.*, 2000]). Das Dendrogramm wurde mit dem „Neighbor-Joining“-Verfahren (Saitou und Nei, 1987) auf der Basis einer Distanz-Matrix-Analyse unter Berücksichtigung des Korrekturfaktors von Jukes und Cantor (1969) und der ausschließlichen Verrechnung von Nukleotidpositionen mit mindestens 50 % Invarianz konstruiert. Aufgrund der begrenzten Sequenzinformationen (556 Bp) wurden die Klone „M70-R5“ bis „M70-R40“ (R = ribosomale copy DNA von Gesamt-RNA aus Probe M70) in das Dendrogramm mit Parsimony-Methoden eingerechnet. Die 16S rDNA-Sequenzen der Typ-II-MAB *Methylocystis parvus* und *Methylocystis* sp. M (α -Proteobacteria) wurden benutzt, um die Wurzel des Dendrogramms zu bestimmen. Der Entfernungsmaßstab entspricht zehn kalkulierten Nukleotidsubstitutionen pro 100 Nukleotidpositionen.

Transkription der 16S rRNA mit dem 3'-Primer MethT1aR (= „MethT1A“, Tabelle 4) erfolglos war. Obiger Primer wurde deshalb durch den 3'-Primer MethT1bR (= „MethT1B“, Tabelle 4) ersetzt. Dies führte zu unterschiedlich großen Amplikons, d.h. im Falle von „MethT1A“ zu 922 Bp bei (Proben M84 und M90) und im Falle von „MethT1B“ zu 556 Bp für (Probe M70). Das Detektionssystem „MethT1A“ erwies sich als hochspezifisch. Alle untersuchten Klonsequenzen konnten den Typ-I-MAB innerhalb der γ -Subklasse der *Proteobacteria* zugeordnet werden. Die vergleichende Sequenzanalyse führte zum Nachweis von vier distinkten Gruppen, die innerhalb der Gattungen *Methylomonas*, *Methylomicrobium*, *Methylococcus* oder *Methylobacter* gruppierten (Abb. 8). Die Abbildung zeigt, daß alle Typ-I-MAB eine gemeinsame phylogenetische Abzweigung gegenüber den nicht-methanotrophen Referenzorganismen innerhalb der γ -Subklasse der *Proteobacteria* aufweisen. Dies erlaubt die Schlußfolgerung, daß sich die Umwelt-16S rDNA-Sequenztypen eindeutig von methanotrophen Organismen herleiten. Abgesehen von der Gattung *Methylococcus* wurden über den RNA-Ansatz (Proben „M70R“ in Abb. 8) die gleichen Typ-I-Gattungen, wie über den DNA-Ansatz nachgewiesen.

3. Metanotrophe (MAB) im Wiesenboden

Als weiteres Habitat wurde das Vorkommen von MAB in einem Wiesenboden untersucht. Hierfür wurden DGGE-Techniken, die auf Basis des Detektionssystems „*pmoA*“, sowie auf den 16S rDNA-basierenden Nachweissystemen „9 α “ und „10 γ “ (Tab. 4) entwickelt worden waren, angewendet (Henckel *et al.*, 1999). Zusätzlich wurde eine Klonbibliothek auf Basis des Detektionssystems „MethT2“ (Tab. 4) erstellt. Genomische DNA wurde aus Bodenproben extrahiert, welche im Winter (Februar) und im Sommer (Juni) entnommen worden waren. Während die Anwendung der Detektionssysteme „9 α “ und „10 γ “ bei allen Proben zu Amplikons mit den erwarteten Fragmentgrößen führte, war dies mit „*pmoA*“ nur bei der im Winter entnommenen Probe möglich. Dies war Anlaß für ein Inkubationsexperiment mit CH₄, um ein Wachstum von MAB zu stimulieren und somit ein *pmoA*-Signal in der Sommerprobe zu erhalten. Um zweifelsfrei eine Korrelation zwischen der Methaninkubation und detektierbarer MAB herstellen zu können, erfolgte parallel eine Inkubation ohne CH₄.

3.1 Inkubationsexperiment mit CH₄

20 g des Bodenmaterials (Sommer) wurden in sterilen Serumflaschen mit ca. 40.000 ppmv CH₄ für zehn Tage (wie unter III 4.1.2 beschrieben) inkubiert. Nach ca. 80 Stunden begann die CH₄-Oxidation (Abb. 10). Der CH₄-Verbrauch setzte sich dann linear fort, und nach 160 Stunden war das CH₄ vollständig verbraucht. In der Negativkontrolle (eine mit CH₄ inkubierte Serumflasche ohne Probenmaterial) blieb die CH₄-Konzentration weitgehend konstant.

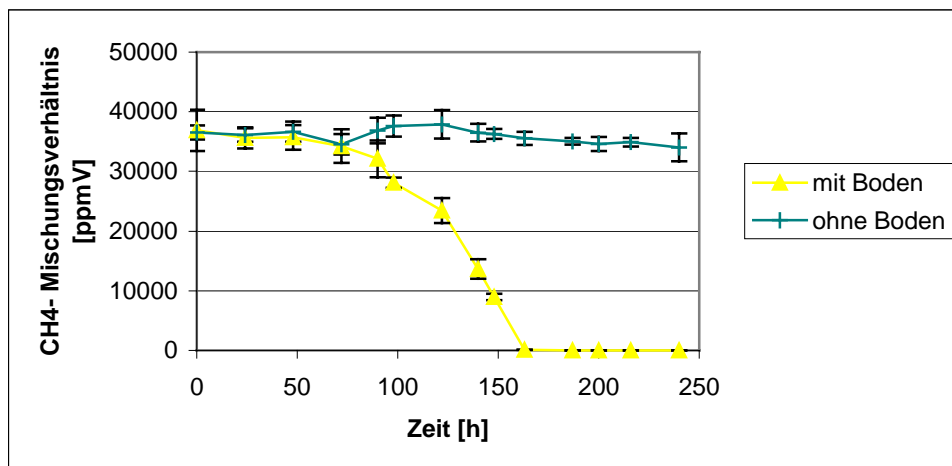


Abb. 10: Methanoxidation in Serumflaschen, die mit 40000 ppmv CH₄ und 20 g Wiesenboden (Sommer) oder ohne Wiesenboden für 10 Tage inkubiert wurden. Die Inkubation erfolgte jeweils in zwei parallelen Ansätzen.

3.2 Genetische „Fingerprints“ (T-RFLP und DGGE) auf Basis von „*pmoA*“

Die T-RFLP-Analyse mit *pmoA*-Amplikons der Winterprobe (ohne CH₄-Inkubation) und der Sommerprobe (nach CH₄-Inkubation) führte zu einem unterschiedlichen T-RF-Muster (Abb. 11B). Die Winterprobe enthielt ein einzelnes T-RF der Größe von 80 Bp, wohingegen in der Sommerprobe drei T-RFs (47 Bp, 245 Bp und 350 Bp) nachgewiesen wurden. Der starke Unterschied zwischen den beiden Proben wurde auch durch die „*pmoA*“-DGGE Analyse deutlich (Abb. 11C). Reamplifizierte DGGE-Banden konnten sequenziert und phylogenetisch verrechnet werden. Zwei der DGGE-Banden (DGGE I und II) aus der Winterprobe zeigten eine hohe Sequenzidentität zu Klonsequenzen die aus einer CH₄-Anreicherung aus einem sauren Torfmoor erhalten wurden (Dedysh, unveröffentlicht). Diese Sequenzen formten eine separate Linie innerhalb des *pmoA*-Stammbaums, welche zusammen mit einem neu beschriebenen *pmoA*-Cluster (Klonsequenzen aus Waldboden [Holmes *et al.*, 1999; Henckel *et al.*, 2000]) eine neue Entwicklungslinie darstellt (Abb. 11A und C). Die DGGE-Banden aus der Sommerprobe mit CH₄-Inkubation hingegen gruppieren entweder

zusammen mit *Methylobacterium album* (DGGE III), innerhalb der Gattung *Methylobacter* (DGGE IV), oder zusammen mit der *amoA* von *Nitrosospora multiformis* (DGGE-Banden V und VI) (Abb. 11A und C). Alle detektierten Sequenztypen besaßen *MspI*-spezifische Schnittstellen, welche mit den T-RFs der unabhängig durchgeführten T-RFLP-Analyse exakt übereinstimmten. Das 80-Bp T-RF korrespondierte mit den Sequenzen DGGE I und II. Die DGGE-Bande III war durch das T-RF von 350 Bp, welches auch für *Methylobacterium album* spezifisch ist, charakterisiert. Das für Typ-II-MAB spezifische T-RF von 245 Bp indizierte die DGGE-Bande IV. Die *Nitrosospora multiformis*-verwandten Sequenzen (DGGE-Banden V und VI) wurden durch das T-RF von 47 angesprochen.

Beide „Fingerprinting“-Methoden (DGGE und T-RFLP-Analyse) zeigten an, daß die *Methylobacterium album*-verwandte Sequenz den Hauptanteil in der CH₄-inkubierten Sommerprobe ausmachten (Abb. 11B I und 11C, Spur I).

Abb11: Evolutionäres Entfernungsdiagramm (A) von *pmoA*-und *amoA*-Gensequenzen basierend auf 165 abgeleiteten Aminosäurepositionen im Vergleich zu „*pmoA*“-T-RFLP-Profilen (B) und „*pmoA*“-DGGE-Profilen (C). Die genetischen „Fingerprinting“-Analysen (T-RFLP und DGGE) wurden mit den gleichen Wiesenproben durchgeführt. **A:** Der Algorithmus von Kimura (1983) wurde als Grundlage für die Berechnung der Aminosäuresubstitutionen herangezogen. Die Ermittlung der Stammbaumtopologie erfolgte unter Anwendung der Neighbor-Joining-Methode (Saitou & Nei, 1987). Das Dendrogramm zeigt die DGGE-Umweltsequenzen in Relation zu Reinkulturen von MAB und AAOB sowie zu weiteren Umweltsequenzen. Folgende Umweltsequenzen von *pmoA* wurden als Referenzen mit eingerechnet: „Bakchar 2“, „Bakchar 7“ und „Bakchar 31“ (Anreicherungen aus einem sauren Torfmoor [Dedysh, unveröffentlicht]; „RA14“, „RA21“, „Rold1“, „Rold4“ und „Rold5“ (Buchenwald in Dänemark), „Pantanal11“ und „Pantanal13“ (Regenwald in Brasilien), „Maine6“ und „Maine10“ (Mischwald in den USA [Holmes *et al.*, 1999]), „DGGE-MR2“, und „DGGE-MR1“ (Laubwald in der Nähe von Marburg, Deutschland) [Henckel *et al.*, 2000], „He-IV“ und „He-VI“ (inkubierter Reisfeldboden [Henckel *et al.*, 1999]); Ebenfalls miteinbezogen wurden die in dieser Arbeit determinierten Umweltklone von Reisswurzeln. Die Sequenzen der *pmoA*-Cluster I bis III sind in Form von Dreiecken dargestellt. Der Entfernungsmaßstab entspricht zehn kalkulierten Aminosäuresubstitutionen pro 100 Aminosäurepositionen. **B:** T-RFLP-Analyse von *MspI*-geschnittenen *pmoA*-PCR-Produkten von einem Wiesenboden (I = Probenentnahme im Sommer + CH₄-Inkubation, siehe IV.3.2; II = Probenentnahme im Winter; Direktanalyse ohne CH₄-Inkubation). Die Zahlen in den farbigen Kästchen geben die Größe der T-RFs in Bp an, welche phylogenetisch definierten Gruppen von MAB oder AAOB zugeordnet werden konnten (siehe auch farbige Pfeile). **C:** „*pmoA*“-DGGE-Profil generiert aus Wiesenboden. Für eine vergleichende Sequenzanalyse, wurden die DGGE-Banden ausgeschnitten, reamplifiziert und über DGGE-Analyse reanalysiert, um die elektrophoretische Mobilität der ausgeschnittenen Banden zu verifizieren. Die mit * versehenen Banden konnten nicht reamplifiziert werden. Spur I = Probenentnahme im Sommer + CH₄-Inkubation, siehe IV. 3.2; II = Probenentnahme im Winter: Direktanalyse ohne CH₄-Inkubation).

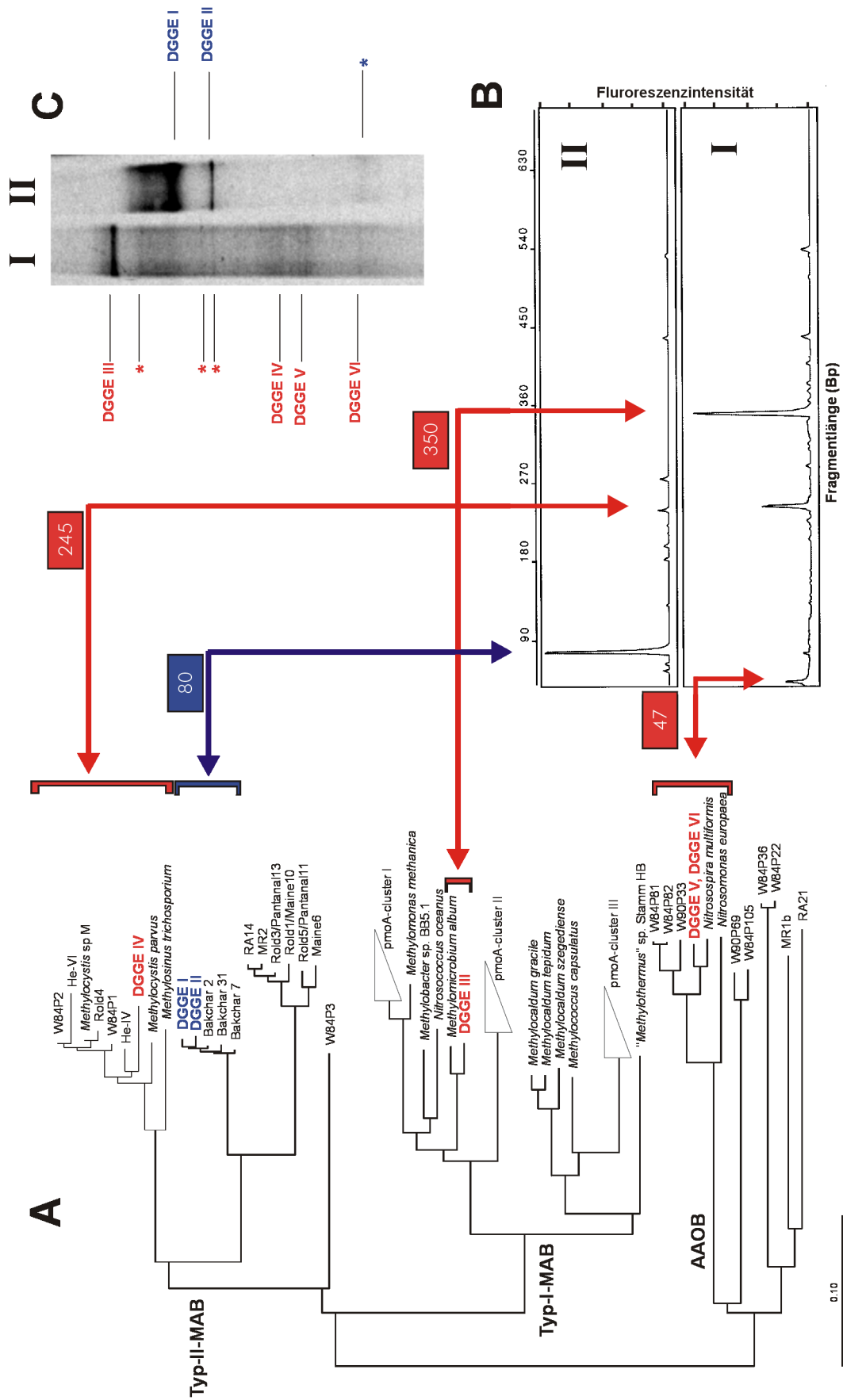


Abb.: 11 A bis C

3.3 DGGE von 16S rRNA-Genen („9α“)

16S rDNA-Analysen des Wiesenbodens wurden mit Winterproben (unbehandelt) sowie mit Sommerproben (mit und ohne CH₄-Inkubation) durchgeführt. Die DGGE-Banden der mit dem Detektionssystem „9α“ generierten Amplikons zeigten deutliche Unterschiede in den einzelnen Proben (Abb. 12B, Spur I bis IV). Während in der Winterprobe (Spur IV) elf Banden (Banden 13 bis 32) analysiert werden konnten, zeigte die Sommerprobe ohne Inkubation (Spur III) lediglich fünf Banden. Nach der CH₄-Inkubation stieg die Anzahl der DGGE-Banden jedoch wieder stark an (Spur I, Banden 1 bis 12). Dieses Bandenmuster unterschied sich aber stark von dem Bandenmuster der Winterprobe (Spur IV). Die Negativkontrolle (= Inkubation ohne CH₄-Zugabe; Spur II) hingegen war nahezu identisch mit der Sommerprobe, welche ohne Inkubationsexperiment in die Analyse eingesetzt wurde. Alle sequenzierten DGGE-Banden fielen in die Gruppe der *α-Proteobacteria*. Überraschenderweise bildete der Großteil der sequenzierten DGGE-Banden zusammen mit anderen Umweltsequenzen ein aus mehreren Untergruppen bestehendes distinktes Cluster ohne direkte phylogenetische Beziehung zu bekannten Isolaten. Die Stammbaumtopologie (Abb. 12A) zeigt, daß dieses Cluster gemeinsam mit der *Methylosinus/Methylocystis*-Gruppe und mit einem weiteren Cluster, in dem neben nicht-methanotrophen Organismen das methanotrophe Bakterium (*Methylocella palustris* [Dedysh *et al.*, 2000] gruppiert, abzweigt. Diese drei phylogenetisch kohärenten Gruppen wiederum sind im Stammbaum deutlich von allen anderen nicht-methanotrophen Organismen aus der Subklasse der *α-Proteobacteria* abgegrenzt. Die vergleichende Sequenzanalyse gruppierte fünf DGGE-Banden (Banden 6, 16, 31 und 32) in die Nähe von *Sphingomonas parapaucimobilis*, gehörten also nicht zu methanotrophen Organismen. Eine einzelne Bande aus der Winterprobe (Bande 13) gruppierte in unmittelbare Nähe zu *Afipia* genosp. 6.

Da mit dem Detektionssystem „9α“ keine bekannten Gruppen von Typ-II-Methanotrophen detektiert werden konnte, erfolgte eine weitere Charakterisierung über das Detektionssystem „MethT2“, welches kürzlich als hochspezifisch für Typ-II-MAB beschrieben worden war (Wise *et al.*, 1999). Genomische DNA des Wiesenbodens (Winter) wurde zur Amplifikation eingesetzt und das resultierende Amplikon von 1008 Bp kloniert. Die vergleichende Sequenzanalyse von neun Klonen gruppierte alle Sequenztypen innerhalb der *α-Proteobacteria*. Hiervon fielen vier Klone in das oben angesprochene DGGE-Cluster (Abb. 12A). Die verbleibenden fünf Klone formten ein distinktes Cluster mit moderater Verwandtschaft zu *Azospirillum brasiliense*. Auch mit diesem Detektionssystem wurden keine derzeit bekannten methanotrophe Populationen detektiert.

Abb.12: **A:** Evolutionäres Entfernungsdiagramm von 16S rDNA-Umweltsequenzen, die von „9 α “-DGGE-Banden (Banden 1 bis 32) und von klonierten „MethT2“-Amplikons (Klone „O2T2“, gelb unterlegt) erzeugt wurden. Die DGGE-Banden wurden entsprechend ihrer Herkunft aus dem DGGE-Gel (unter (B) beschrieben) farbig dargestellt. Das Dendrogramm wurde mit dem "Neighbor-Joining"-Verfahren (Saitou und Nei, 1987) auf der Basis einer Distanz-Matrix-Analyse unter der Berücksichtigung des Korrekturfaktors von Jukes und Cantor (1969) und der ausschließlichen Verrechnung von Nukleotidpositionen mit mindestens 50 % Invarianz konstruiert. Aufgrund begrenzter Sequenzinformationen (391 Bp) wurden die DGGE-Banden in das Dendrogramm mit Parsimony-Methoden eingerechnet. Das Dendrogramm zeigt Umweltsequenzen aus Wiesenboden im Vergleich zu methanotrophen und nicht-methanotrophen Reinkulturen innerhalb der *α -Proteobacteria* sowie weiteren Umweltsequenzen aus Boden: „TM9“, „TM12“ und „TM113“ (Rheims *et al.*, 1996), aus einem australischen Boden („MC5“ und „MC77“ [Stackebrandt *et al.*, 1993]), aus Boden, der mit ¹³C-Methanol exponiert wurde, („UP1“ und „UP2“ [Radajewski *et al.*, 2000]), aus Wiesenboden („DA122“ [Felske *et al.*, 1998]), und aus einem sauren Torfmoor („MHP14“ und „MHP17“, [McDonald *et al.*, 1996]). Die 16S rDNA-Sequenzen von *Methylobacterium methanica* (*γ -Proteobacteria*) und von *Nitrosomonas multififormis* (*β -Proteobacteria*) wurden benutzt, um die Wurzel des Dendrogramms zu bestimmen. Der Entfernungsmaßstab entspricht zehn kalkulierten Nukleotidsubstitutionen pro 100 Nukleotidpositionen. **B:** „9 α “-DGGE-Profil generiert aus vier gleichen Bodenproben einer Wiese, die unterschiedlich behandelt bzw. zu verschiedenen Zeitpunkten (Winter/Sommer) entnommen worden war. Spur I bis III: Sommerproben (Spur I = Inkubationsexperiment mit CH₄-Zugabe, sequenzierte Banden in grün; Spur II = Inkubationsexperiment ohne CH₄-Zugabe [Negativkontrolle], sequenzierte Banden in lila; Spur III = Direktanalyse der Sommerprobe, sequenzierte Banden in rot; Spur IV = Direktanalyse der Winterprobe, sequenzierte Banden in blau.

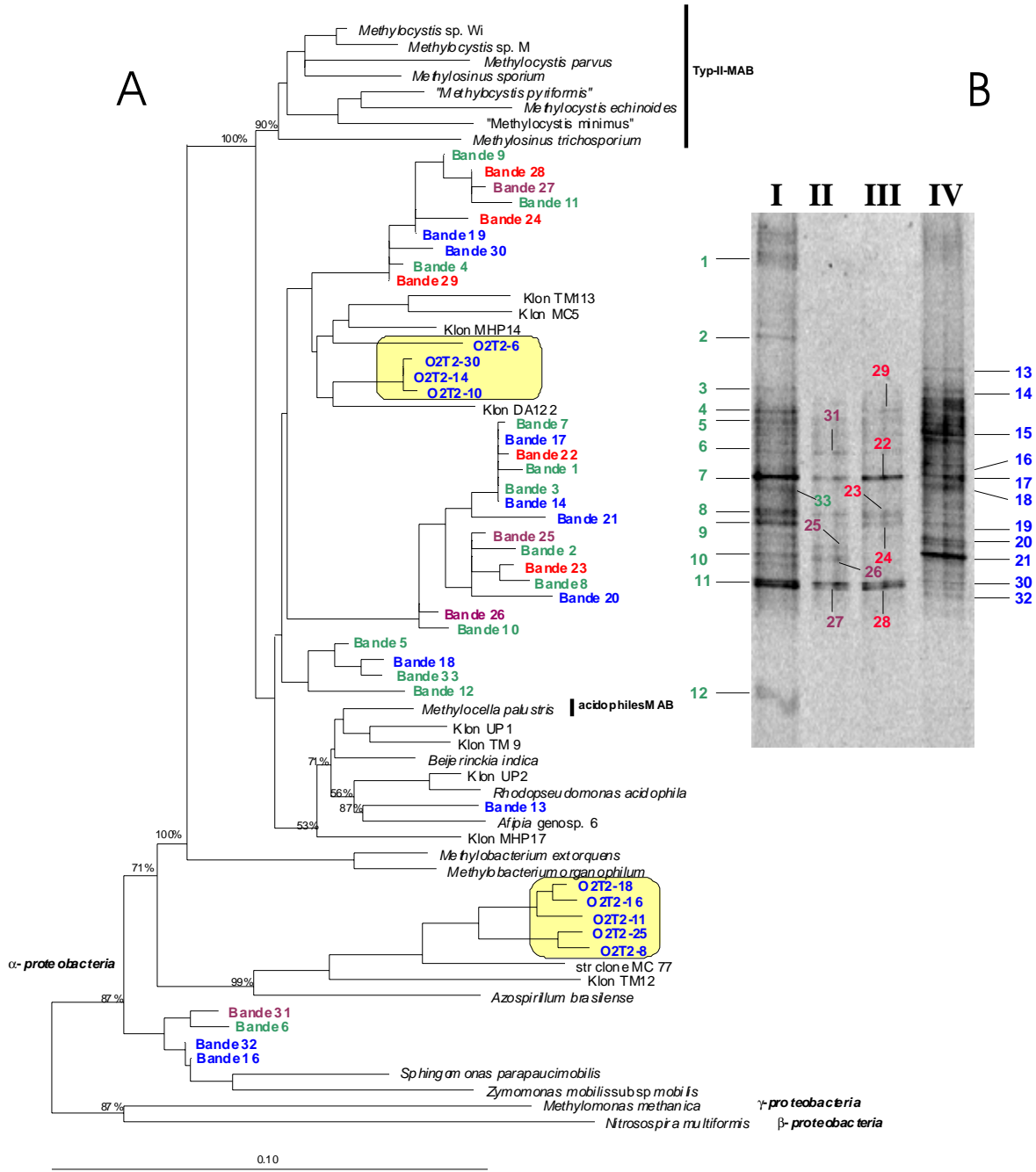


Abb.12 A und B

Abb.13: **A:** Evolutionäres Entfernungsdiagramm von 16S rDNA-Umweltsequenzen, die von „10γ“-DGGE-Banden (Banden 1 bis 10) erzeugt wurden. Die DGGE-Banden wurden entsprechend ihrer Herkunft aus dem DGGE-Gel (unter (B) beschrieben), farbig dargestellt. Das Dendrogramm wurde mit dem „Neighbor-Joining“-Verfahren (Saitou und Nei, 1987) auf der Basis einer Distanz-Matrix-Analyse unter der Berücksichtigung des Korrekturfaktors von Jukes und Cantor (1969) und der ausschließlichen Verrechnung von Nukleotidpositionen mit mindestens 50 % Invarianz konstruiert. Aufgrund begrenzter Sequenzinformationen (336 Bp) wurden die DGGE-Banden in das Dendrogramm mit Parsimony-Methoden eingerechnet. Das Dendrogramm zeigt die Umweltsequenzen im Vergleich zu 16S rDNA-Sequenzen von Typ-I-Methanotrophen und nicht-methanotrophen Reinkulturen innerhalb der *γ-Proteobacteria* sowie die in dieser Arbeit determinierten Klonsequenzen aus Reiswurzeln, welche innerhalb der Gattung *Methylococcium* gruppieren. Die 16S rDNA-Sequenzen von *Methylocystis parvus* und *Methylocystis* sp. M (*α-Proteobacteria*) wurden benutzt, um die Wurzel des Dendrogramms zu bestimmen. Der Entfernungsmaßstab entspricht zehn kalkulierten Nukleotidsubstitutionen pro 100 Nukleotidpositionen. **B:** „10γ“-DGGE-Profil generiert aus vier gleichen Bodenproben einer Wiese, die unterschiedlich behandelt bzw. zu verschiedenen Zeitpunkten (Winter/Sommer) entnommen wurden. I und II: Inkubierte Sommerproben (Spur I = Inkubationsexperiment mit CH₄-Zugabe, Spur II = Inkubationsexperiment ohne CH₄-Zugabe [Negativkontrolle], Spur III = Direktanalyse der Winterprobe, Spur IV = Direktanalyse der Sommerprobe).

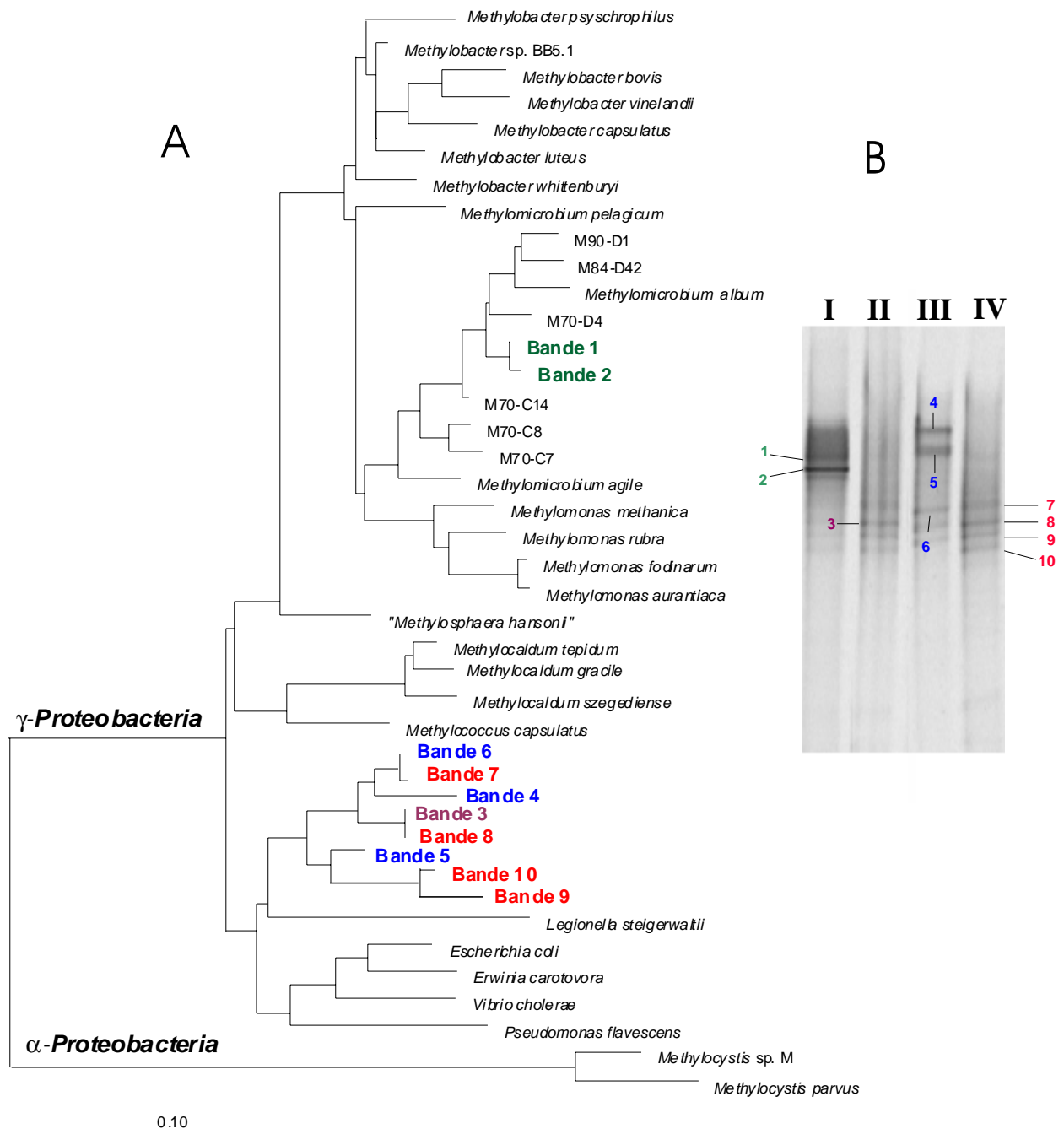


Abb. 13 A und B

3.4 DGGE von 16S rRNA-Genen („10 γ ")

Zur Charakterisierung der Typ-I-MAB aus der Klasse der γ -Proteobacteria erfolgte die DGGE-Analyse mit dem Detektionssystem „10 γ ". In der Winterprobe dominierten zwei starke Banden (Abb. 13B, Spur III, Banden 4 und 5). Drei weitere Banden zeigten die gleiche

elektrophoretische Mobilität, wie das Bandenmuster der Sommerprobe (Spur IV, Banden 7 bis 9). Sowohl die Banden der Winter- als auch der Sommerprobe (Banden 4 bis 10) formten nach der Sequenzanalyse ein distinktes Cluster, das mit *Legionella steigerwaltii*, einem nicht-methanotrophen Organismus, moderat verwandt war. Das Inkubationsexperiment mit der Sommerprobe hingegen zeigte, daß *Methylomicrobium album*-verwandte Organismen in der CH₄-inkubierten Sommerprobe angereichert worden waren (Spur I, Banden 1 und 2). In der Negativkontrolle (Inkubation ohne CH₄) war dies nicht der Fall. Das Bandenmuster war hier vergleichbar mit dem der Sommerprobe, die direkt in die DGGE-Analyse mit eingesetzt worden war (Spur II im Vergleich zu Spur IV). Der Nachweis von *Methylomicrobium album*-verwandten Sequenztypen konnte also eindeutig auf die CH₄-Inkubation zurückgeführt werden.

V. Diskussion

1. Molekulare Charakterisierung von Ammoniak-Oxidierern

1.1 Voraussetzungen für eine *amoA*-gestützte T-RFLP-Analyse

Die Ammoniak-Monooxygenase (AMO) ist für alle autotrophe Ammoniak-Oxidierer als essentielles Schlüsselenzym im Stoffwechselweg dieser physiologischen Gruppe ein gemeinsames Charakteristikum. Auf Basis des Gens (*amoA*), das für die α -Untereinheit des Enzyms AMO kodiert, wurde von Rotthauwe *et al.*, (1997) ein PCR-Nachweissystem entwickelt und zur Untersuchung von natürlichen Populationen an AAOB in Reisfeldboden angewandt. Das Nachweissystem zeichnete sich durch seine hohe Zielspezifität für *amoA* aus, was eine zuverlässige molekular-ökologische Untersuchung der *Nitrosomonas/Nitrosospira*-Gruppe ermöglichte. Die Spezifität der Primer-Paare für konservierte Regionen innerhalb der *amoA* war die Voraussetzung dafür, das Vorkommen und die Diversität von AAOB über einen klonierungsunabhängigen, genetischen Fingerabdruck sicher und reproduzierbar darzustellen. Im Gegensatz dazu wurden mit PCR-Nachweissystemen, welche zur spezifischen Detektion der 16S rRNA-Gene von AAOB innerhalb der β -*Proteobacteria* entwickelt worden waren, auch die 16S rRNA-Gene von nicht-nitrifizierenden Bakterien co-amplifiziert (Stephen *et al.*, 1996). Auf Basis des entwickelten Nachweissystems „*amoA*“ erstellte Rotthauwe (1997) zwar erste T-RFLP-Profile mit dem Restriktionsenzym *TaqI*, eine Korrelation zu distinkten Gruppen an AAOB wurde jedoch noch nicht hergestellt. So führte Rotthauwe (1997) ein 491-Bp T-RF auf die unvollständige Restriktion durch *TaqI* zurück (491 Bp = Gesamtgröße des Amplikons). Es konnte jedoch durch die in dieser Arbeit identifizierten Sequenzen, welche eine Untergruppe des „Schöhsee“-Clusters bilden, gezeigt werden, daß es sich dabei nicht um ein methodisch bedingtes Artefakt handelte (keine *TaqI*-Schnittstelle [Abb. 1]). Dies belegt die Notwendigkeit einer permanenten Erweiterung der *amoA*-Datenbank. Neben dem Ausbau der *amoA*-Sequenzdatenbank (Reinkulturen, Umweltklone) sollte die ökologische Aussagekraft der *amoA*-gestützten T-RFLP-Analyse zur Beschreibung der Diversität von AAOB in verschiedenen Ökosystemen evaluiert werden.

1.2 Phylogenetische Beziehung zwischen AAOB auf Basis von *amoA* und 16S rDNA

Kurz vor Fertigstellung dieser Doktorarbeit (Dezember 2000) wurde ein vollständiger Datensatz von 16S rDNA- und *amoA*-Sequenzen aller bekannten Spezies von AAOB veröffentlicht (Purkhold *et al.*, 2000). Dieses Projekt wurde im Rahmen einer Kooperation zwischen dem Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München und dem Institut für allgemeine Botanik, Abteilung Mikrobiologie der Universität Hamburg, wo auch die Stammsammlung der AAOB-Reinkulturen ansässig ist, durchgeführt. Die vergleichende Sequenzanalyse beider Datensätze führte zu erweiterten Erkenntnissen hinsichtlich der phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse zwischen *Nitrosomonas*- und *Nitrosospira* spp. (Purkhold *et al.*, 2000). Auf die neuen Sequenzdaten war bis einschließlich 15. Dezember 2000 kein Zugriff über öffentliche Datenbanken möglich. Es wird dennoch versucht die wesentlichen Neuheiten auf Basis der von Purkhold *et al.*, (2000) beschriebenen Ergebnisse zu evaluieren. Hinsichtlich des Aspekts „bisheriger Sequenzdatensatz“ - „erweiterter Sequenzdatensatz“ erfolgt die Diskussion auf zwei verschiedenen Ebenen. Zunächst werden die phylogenetischen Beziehungen zwischen den *Nitrosomonas* spp. und *Nitrosospira* spp. unter Zugrundelegung der bisherigen Sequenzinformationen beschrieben (A). Anschließend wird auf das von Purkhold *et al.*, (2000) neu beschriebene Konzept der molekularen Klassifizierung von AAOB unter Berücksichtigung des erweiterten Sequenzdatensatzes eingegangen (B). Die Bedeutung der *amoA*-gestützten T-RFLP-Analyse mit *TaqI* wird in Abschnitt V.1.3 im Hinblick auf den erweiterten Sequenzdatensatz neu verifiziert.

(A): Vergleichende phylogenetische Analysen von AAOB auf Basis des bisherigen Datensatzes

In der vorliegenden Arbeit wurden Teilabschnitte der *amoA* von *Nitrosospira* sp. L13, *Nitrosomonas nitrosa* und *Nitrosomonas halophila* sequenziert und deren phylogenetische Beziehung zur *amoA* anderer AAOB analysiert (Abb. 1). Dabei gruppierte die *amoA* von *Nitrosospira* L13 eng zur *amoA* von *Nitrosospira multiformis* C71 mit 99% Sequenzidentität auf Aminosäureebene (Abb. 1). *Nitrosomonas nitrosa* und *Nitrosomonas halophila* gruppierten separat innerhalb des *Nitrosomonas*-Entwicklungszweiges und zeigten auf Aminosäureebene moderate Verwandtschaft zur *amoA* von *Nitrosomonas europaea* (90% bzw. 95%). Pommerening-Röser *et al.*, (1996) formulierten sechs Linien innerhalb der *Nitrosomonas*-Gruppe auf Basis von 16S rDNA-Analysen. Es konnte zudem gezeigt werden, daß die Existenz dieser Linien mit ökophysiologischen Eigenschaften dieser Organismen einhergeht. Ein Vergleich zwischen 16S rDNA- und *amoA*-Stammbaum zeigt, daß die Position von *Nitrosomonas halophila* im *amoA*-Stammbaum die Zugehörigkeit in die von

Pommerening-Röser beschriebene „halotolerante“ *Nitrosomonas europaea*-Linie (Abb. 3) bestätigt. Die Organismen dieser Gruppe sind durch das Fehlen der ansonsten unter vielen AAOB üblichen Urease-Aktivität charakterisiert. *Nitrosomonas nitrosa* gruppiert auf Basis von 16S rDNA-Sequenzdaten innerhalb der *Nitrosomonas communis*-Linie (Pommerening-Röser *et al.*, 1996). Da *amoA*-Sequenzen von *Nitrosomonas communis*-verwandten Organismen bislang noch nicht vorlagen, konnte die Position von *Nitrosomonas nitrosa* im *amoA*-Stammbaum noch nicht verifiziert werden.

Generell zeigte die Topologie des *amoA*-Stammbaums eine weitgehende Übereinstimmung mit der des korrespondierenden 16S rDNA-Stammbaums (Rotthauwe, 1997). Die AAOB innerhalb der β -*Proteobacteria* wurden über beide Datensätze phylogenetisch in die zwei Hauptentwicklungslinien *Nitrosomonas* und *Nitrosospira* unterteilt. Zwei Ausnahmen werden jedoch im *amoA*-Stammbaum in Abb. 1 ersichtlich: Die *amoA* von *Nitrosomonas marina* und *Nitrosomonas urea* (einschließlich hierzu korrespondierenden *amoA*-Umweltsequenzen „Schöhsee“, „TUK“ und „ASK“) gruppierten gemeinsam mit den *Nitrosospira* spp. auf einem Entwicklungsast. Die Anwendung unterschiedlicher Algorithmen (Felsenstein, 1989; Kimura, 1983; Dayhoff, 1979) bestätigte diese Eingruppierung in die *Nitrosospira*-Linie. Der Einfluß unterschiedlicher mathematischer Evolutionsmodelle war also nicht für die Diskrepanz zwischen der 16S rDNA-Phylogenie und der von *amoA*-Sequenzen abgeleiteten Phylogenie entscheidend.

(B): Vergleichende phylogenetische Analysen von AAOB auf Basis des erweiterten Datensatzes

Erst durch die Sequenzierung der kompletten 16S rDNA und partiellen *amoA* aller derzeit bekannten Reinkulturen an AAOB sowie die phylogenetische Analyse auf Basis beider Datensätze (Purkhold *et al.*, 2000) ergaben sich neue Erkenntnisse bezüglich der Verwandtschaftsverhältnisse der AAOB. Es wurde gezeigt, daß die bisherige Zweiteilung in die Gattungen *Nitrosomonas* und *Nitrosospira* sowohl auf Basis des 16S rRNA-Gens als auch auf Basis des Gens für *amoA* keine Gültigkeit mehr hat. Aufgrund des erweiterten Datensatzes wurde die Bildung von fünf monophyletischen 16S rDNA-Gruppen innerhalb der β -*Proteobacteria* vorgeschlagen, wobei sich die frühere Annahme, daß alle Nitrosomonaden untereinander näher verwandt sind als zu *Nitrosospira* spp. als falsch erwiesen hat. Purkhold *et al.*, (2000) beschreiben, daß die Stammbaumtopologie zwischen dem funktionellen Genmarker (*amoA*) und phylogenetischen Genmarker (16S rDNA) ähnlich ist, aber nicht identisch. Die Existenz von drei der fünf vorgeschlagenen distinkten 16S rDNA-Gruppen wurde auch durch die *amoA*-Phylogenie bestätigt. Diese sind das *Nitrosospira*-Cluster, das *Nitrosomonas europaea*-Cluster (einschließlich *Nitrosomonas eutropha*, *Nitrosococcus mobilis*, *Nitrosomonas halophila*, *Nitrosomonas* sp. 103 und 104) sowie das *Nitrosomonas*

marina-Cluster (einschließlich *Nitrosomonas* Nm 51 und *Nitrosomonas aestuarii*). Auf Basis der 16S rDNA schlagen die Autoren zusätzlich ein *Nitrosomonas communis*-Cluster (einschließlich *Nitrosomonas nitrosa* und *Nitrosomonas* spp. 33 und 41) und *Nitrosomonas oligotropha*-Cluster (einschließlich *Nitrosomonas urea*) vor. Die phylogenetische Neuordnung innerhalb der *Nitrosomonas/Nitrospira*-Gruppe zeigte deutlich, wie wichtig ein umfassender Datensatz (einschließlich der Verrechnung von 16S rDNA-Vollsequenzen) ist, um die mikrobiellen Verwandtschaftsverhältnisse möglichst objektiv darstellen zu können. Es dokumentiert zudem die Dynamik phylogenetischer Stammbäume, die sich verändern, sobald neue Sequenzinformationen miteinbezogen werden (Ludwig *et al.*, 1998).

Die abweichenden Stammbaumtopologien auf Basis von *amoA* und 16S rDNA dürften in den unterschiedlichen Evolutionsraten der Gene begründet liegen (Ludwig *et al.*, 1998). Das 16S rDNA-Molekül wird jedoch generell als geeigneter phylogenetischer Genmarker angesehen, um die evolutionären Beziehungen der Mikroorganismen widerzuspiegeln (Ludwig *et al.*, 1998). Der besondere Vorteil der 16S rDNA für phylogenetische Analysen liegt in der hohen funktionellen Konstanz dieses Moleküls begründet, während Proteine meist einem stärkeren funktionellen (Selektions-)Druck unterliegen. Aus diesen Gründen reflektieren gerade lokale Verzweigungsmuster in Protein-Stammbäumen eher die Phylogenie der einzelnen Gene und weniger die der dazu korrespondierenden Arten (Ludwig und Schleifer, 1994). Ein zusätzlicher Konflikt kann bei der vergleichenden phylogenetischen Analyse mit unterschiedlichen Datensätzen aufgrund der Möglichkeit des horizontalen Gentransfers auftreten.

1.3 Korrelation von T-RFs zu distinkten Gruppen an AAOB

Die von Purkhold *et al.*, (2000) veröffentlichten *amoA*-Sequenzen erlaubten eine nachträgliche Evaluierung der auf *TaqI*-basierenden T-RFLP-Analyse und die zuvor postulierten Zuordnungen definierter T-RFs. Es zeigte sich zum einen, daß der spezifische Charakter des T-RFs der Größe von 283 Bp für die phylogenetisch kohärente Gruppe der *Nitrospira* spp. uneingeschränkte Gültigkeit besitzt. Darüber hinaus werden mit dem 219-Bp T-RF zweifelsfrei Mitglieder des *Nitrosomonas europaea*-Clusters detektiert. Das 48-Bp T-RF kann jedoch auf Organismen des *Nitrosomonas marina*-Clusters sowie auf *Nitrosomonas nitrosa*, *Nitrosomonas urea* und *Nitrosomonas oligotropha* hinweisen. Das 491-Bp T-RF hingegen korrespondiert mit *Nitrosomonas-communis*, *Nitrosomonas* Nm 41, *Nitrosomonas aestuarii* und *Nitrosomonas cryotolerans*. Dies bedeutet, daß der Nachweis von T-RFs der Größe von 48 und 491 Bp nur noch eine bedingte Aussagekraft hat. Es ist daher erforderlich, auf Basis des neuen, umfassenderen *amoA*-Datensatzes zusätzliche

Restriktionsenzyme abzuleiten und ihre Eignung für T-RFLP-Analysen experimentell zu evaluieren. Mit der Erstellung zweier separater T-RF-Profile unter Verwendung eines weiteren Restriktionsenzym (neben *TaqI*) sollte die Auflösung distinkter Gruppen an AAOB möglich sein. Eine weitere interessante Möglichkeit bietet die parallele Anwendung von T-RFLP-Analysen und DGGE. Auf diese Weise könnten methodisch-bedingte Limitierungen beider Ansätze wechselseitig ausgeglichen werden. Die Vorteile einer kombinierten Anwendung beider „Fingerprinting“-Methoden konnte anhand von *pmoA*-basierenden Analysen gezeigt werden (V.4). Darüber hinaus ist die DGGE-basierende Analyse von *amoA*-Genen bereits erfolgreich an Reinkulturen und Umweltproben erprobt worden (Avrahami, persönliche Mitteilung).

1.4 Relative Amplifikationseffizienz von *amoA*-Genen

In Abschnitt IV.1.2 (Tab. 6) konnte gezeigt werden, daß die *amoA*-Sequenzen von *Nitrosospira europaea* und *Nitrosospira tenuis* mit weitgehend vergleichbarer Effizienz amplifiziert wurden, wenn die Mischungsverhältnisse beider DNA-Komponenten im Bereich von 1:20 bis 1:1 vorlagen. Das Ergebnis dieses Modellversuches ist nicht übertragbar auf Umweltstudien, in denen unbekannte Zusammensetzungen einer Vielzahl von *amoA*-Sequenztypen amplifiziert werden. Sie zeigen aber zumindest, daß der simultane Nachweis von *Nitrosospira* spp.- und *Nitrosomonas-europaea*-verwandten Sequenzen keiner PCR-bedingten Verzerrung unterliegen muß. Die relativen Abundanzen verschiedener Sequenztypen in PCR-Produkten oder nachfolgend angelegten Klonbibliotheken kann sicherlich nicht als Maßstab für die exakte *in situ*-Zusammensetzung der Zielgruppe sein. Das Resultat des Modellsystems belegt aber, daß Veränderungen zwischen *amoA*-T-RFLP-Profilen indikativ für Unterschiede in den Ausgangs-DNA-Mengen und für Unterschiede in der strukturellen Zusammensetzung der entsprechenden AAOB sind. Diese Interpretation steht im Einklang mit weiteren auf PCR-basierenden Umweltstudien, in denen auf Grund von Veränderung der relativen Abundanzen an *amoA*-Gensequenzen in Klonbibliotheken auf Veränderungen in der Zusammensetzung der bakteriellen Lebensgemeinschaft von AAOB vor bzw. nach experimenteller Behandlung geschlossen wurde (Sarkano und Kerkhof, 1998; Stephen *et al.*, 1999).

1.5 Verbreitung von AAOB in unterschiedlichen Habitaten

Die *amoA*-gestützte T-RFLP-Analyse konnte in Korrelation zu Umweltklonen gebracht werden, welche aus den gleichen Habitaten erhalten worden waren (Abb. 1, Tab. 7). Der Vergleich verschiedener Standorte demonstrierte die individuelle, habitatspezifische Besiedelung durch AAOB. Während *Nitrosospira* spp. die Hauptvertreter an der Reisswurzeln und in der Anreicherungsprobe aus der Ostsee sogar die einzigen detektierbaren AAOB

waren, dominierten in der Teichprobe „TUK“ und der Klärwerksprobe „SP“ *Nitrosomonas europaea*-verwandte Organismen. Neben der Klärwerksprobe „ASK“ wurden *Nitrosomonas urea*-ähnliche Sequenztypen hauptsächlich in den Gewässerproben, „TUK“ und „Schöhsee“ gefunden. *amoA*-Gensequenzen, die aus Proben von drei verschiedenen Seen in Holland (Ijsselmeer, Gooimeer und Drontermeer) erzielt worden waren, bestanden ebenfalls zum überwiegenden Teil aus *Nitrosomonas urea*-ähnlichen Sequenztypen (Speksnijder *et al.*, 1999). Dies läßt eine starke Verbreitung von *Nitrosomonas urea*-verwandten Nitrifizierern in Süßwasser-Habitaten vermuten. Der Vergleich der beiden Klärwerksproben („SP“ und „ASK“) zeigte beträchtliche Unterschiede in der strukturellen Zusammensetzung an AAOB. Die Klärwerksprobe SP enthielt zum großen Teil *Nitrosomonas europaea*- und *Nitrospira*-ähnliche Sequenztypen und nur zu einem geringen Teil *Nitrosomonas urea*-verwandte Sequenzen. Ganz anders verhielt es sich bei der Klärwerksprobe „ASK“. Hier waren ausschließlich *Nitrosomonas urea*-verwandte Sequenztypen vorzufinden. Eine umfangreiche Analyse von 122 *amoA*-Klonen aus elf verschiedenen Klärwerken zeigte, daß *Nitrosomonas* spp., darunter auch *Nitrosomonas urea*, als die dominierenden AAOB vorzufinden waren (Purkhold *et al.*, 2000). Wiederum im Gegensatz dazu wurden über Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) mit 16S rDNA-Sonden, vergleichender Sequenzierung von *amoA*-Genen und Kultivierung/Isolierung *Nitrosococcus mobilis* als dominanter Vertreter in einem Belebtschlammbecken eines Klärwerks nachgewiesen (Juretschko *et al.*, 1998). Diese Heterogenität indiziert möglicherweise die unterschiedlichen Milieubedingungen in den verschiedenen Belebtschlammbecken.

2. Molekulare Charakterisierung von MAB an Reisswurzeln

Ziel dieses Versuchsteils war es, einen möglichst umfassenden Einblick in die Diversität von MAB, welche mit Reisswurzeln assoziiert sind, zu erhalten. Aufgrund der bekannten Tatsache, daß mit Kultivierungen die komplexe Struktur mikrobieller Lebensgemeinschaften nur unzureichend widerspiegelt wird, erfolgte die Untersuchung mit kultivierungsunabhängigen Techniken. Der Schwerpunkt lag dabei auf „*pmoA*“-basierenden Analysen, da bis auf eine Ausnahme (*Methylocella palustris*, Dedysh *et al.*, 1998) alle derzeit bekannten MAB über eine partikuläre Methan-Monooxygenase (pMMO) verfügen. Um zu evaluieren, wie umfangreich mit dem „*pmoA*“-Ansatz die Diversität der wurzelassoziierten Gemeinschaft an MAB nachgewiesen werden konnte, wurden zum Vergleich weitere

Genmarker in die Untersuchung miteinbezogen. Diese erfaßten entweder alle methylo trophen Bakterien (*mxoF*) oder definierte Untergruppen an MAB (*mmoX* oder 16S rDNA-basierende Nachweissysteme mit Zielspezifität für Typ-I-MAB [*γ-Proteobacteria*]). Die Anwendung zweier molekularer „Fingerprinting“-Techniken (T-RFLP-Analyse und DGGE) sowie die vergleichende Sequenzanalyse der verschiedenen Gene führte zur Detektion distinkter methanotropher Populationen. Hierbei wurden teils übereinstimmende und teils konträre Resultate erzielt. Die nachfolgende Diskussion der erzielten Daten konzentriert sich daher auf verschiedene Punkte. Zunächst wird die genetische Diversität der wurzelassoziierten MAB auf Basis der verschiedenen funktionellen und phylogenetischen Genmarker angesprochen (V.2.1 bis V.2.4). Im Anschluß daran erfolgt die methodische Evaluierung des Potentials der auf *pmoA* basierenden T-RFLP-Analyse (V.2.5). Abschnitt V.2.6 widmet sich den Umweltsequenzdaten, welche auf das Vorhandensein bislang unbekannter, wahrscheinlich Methan-oxidierender Mikroorganismen schließen lassen. Im darauffolgenden Abschnitt (V.2.7) wird die ökologische Relevanz der an Reisswurzeln determinierten MAB im Vergleich zu Umweltdaten, die aus dem anoxischen, undurchwurzelter Reissfeldboden gewonnen worden waren, diskutiert.

2.1 Sequenzanalyse von *pmoA*-Genen

Durch vergleichende Sequenzanalyse klonierter *pmoA*-Gene wurden hauptsächlich Typ-I-MAB identifiziert, während nur zwei Klone in die Typ-II-Gruppe fielen. Die nachgewiesenen Sequenztypen innerhalb der Typ-I-MAB, umfaßten die Gattungen *Methylomonas* (*pmoA*-Cluster I), *Methylomicrobium* (*pmoA*-Cluster II) und *Methylococcus* (*pmoA*-Cluster III). Im Gegensatz dazu führte die molekulare Untersuchung von undurchwurzelter Boden aus Reis-Mikrokosmen lediglich zur Detektion von *pmoA*-Genen, welche zu *Methylococcus capsulatus* verwandt waren (Henckel *et al.*, 1999 und 2000). Es ergaben sich also an dieser Stelle erste Evidenzen, daß mit den *pmoA*-Clustern I und II methanotrophe Organismen erfaßt wurden, welche an ein spezifisches Milieu an oder in der Reisswurzel angepaßt waren. Ähnliches könnte für die Sequenztypen zutreffen, welche die Linien A bis C bildeten (siehe auch V.2.6).

2.2 Vergleichende phylogenetische Einordnung von MAB über 16S rDNA- und *pmoA*-Gensequenzen

Die Entwicklung von Primern zur Erfassung der 16S rDNA aller methanotropher Gruppen innerhalb der Familie der *Methylococcaceae* (= Sensitivität des Nachweissystems) unter dem gleichzeitigen Ausschluß nicht-methanotropher Organismen innerhalb der *γ-Proteobacteria* (= Spezifität des Nachweissystems) ist nach Wise *et al.*, (1999) nicht möglich. Erst der kombinierte Einsatz zweier Primer, welche allumfassend für Typ-I-MAB

waren und ein unterschiedliches Spektrum an nicht-methanotrophen Zielorganismen hatten führte zu einem Nachweissystem, das sich als hochspezifisch für Typ-I-MAB erwies (Wise *et al.*, 1999). Dieses Nachweissystem („MethT1A“, Tab. 4) wurde zur Charakterisierung wurzelassoziiierter MAB eingesetzt. Alle untersuchten Klone waren tatsächlich nah verwandt zu bekannten Typ-I-MAB (Abb. 8), was die postulierte Spezifität dieses Nachweissystems bestätigte. Eine bemerkenswerte Kongruenz konnte in der Topologie der Stammbäume, die für *pmoA*- und 16S rDNA-Umweltsequenzen generiert wurden, beobachtet werden (Abb. 4 und 8). So scheint es möglich, daß das *pmoA*-Cluster III und das 16S rDNA-Cluster, welches durch die Klone M90-D37, M84-D38 und M84-D36 charakterisiert wird, die gleiche Organismen-Gruppe beschreiben. Obwohl es nicht möglich ist, eine exakte Verknüpfung zwischen distinkten Clustern von Umweltsequenzen, die mit zwei unterschiedlichen Genmarkern erhalten wurden, herzustellen, weisen die vergleichbaren Stammbaumtopologien dennoch darauf hin (Abb. 4 und 8), daß über beide Ansätze die gleichen Untergruppen an Typ-I-MAB detektiert worden sind. Dieser Befund stimmt gut mit kultivierungsunabhängigen Untersuchungen zur Diversität von MAB in Sedimenten des Lake Washington überein (Costello und Lidstrom, 1999). Der Vergleich von Klonbibliotheken, welche entweder Umweltsequenzen von methanotrophen 16S rDNA- oder *pmoA*-Gensequenzen enthielten, zeigte, daß beide Ansätze die gleiche Bandbreite an MAB-Diversität abdeckten (Costello und Lidstrom, 1999).

Die im Stammbaum in Abb. 8 verrechneten 16S rDNA-Klonsequenzen fielen in die gleichen Sequenzgruppen wie die korrespondierenden 16S rDNA-Sequenzen. In vielen Umweltstudien wurden mikrobielle Populationen über die vergleichende Analyse von extrahierter 16S rRNA und der für die 16S rRNA kodierenden Gene untersucht (Teske *et al.*, 1996; Felske *et al.*, 1997). Anhand von Reinkulturstudien konnte gezeigt werden, daß der Ribosomengehalt einer Zelle und somit der Gehalt an rRNA von der Wachstumsphase abhängt (Rosset, 1966; Wagner, 1994; Aviv *et al.*, 1996). Durch den Nachweis von rRNA konnte also nicht nur auf die Präsenz sondern auch auf eine metabolische Aktivität der nachgewiesenen Typ-I-MAB an der Reisswurzel geschlossen werden.

2.3 Vergleichende Sequenzanalyse von *mxoF*-Genen

Die Mehrzahl der *mxoF*-Klone formte ein distinktes Cluster, welches möglicherweise dem *pmoA*-Cluster I (Abb. 4 und 7) entspricht. Diesem Cluster zugehörige Sequenztypen wurden auch von Henckel *et al.*, (2000) im Reisfeldboden, der mit definierten CH₄/O₂-Mischungsverhältnissen inkubiert worden war, nachgewiesen („MO1“ und „MO2“, Abb. 7). In seinem Experiment inkubierte Henckel (2000) Reisfeldboden mit vier unterschiedlichen Mischungsverhältnissen, in denen er entweder niedrige oder hohe CH₄-Konzentrationen (1000 ppmv oder 10000 ppmv) mit niedrigen oder hohen O₂-Konzentrationen (1% oder

20,5%) kombinierte. Mittels DGGE von amplifizierten *mxoF*-Genabschnitten konnten die oben angesprochenen Sequenzen aber nur unter hoher CH₄- und niedriger O₂-Atmosphäre detektiert werden, nicht aber in den anderen drei Systemen. Dies läßt darauf schließen, daß entsprechende Mikronischen an oder in der Reisswurzel existieren und spezielle Typ-I-MAB an dieses Milieu adaptiert sind.

2.4 Vergleichende Sequenzanalyse von *mmoX*-Genen

Das in dieser Arbeit angewendete Nachweissystem für *mmoX*-Gene (Großkopf, 1994) war im Vergleich zu bereits publizierten *mmoX*-Primer-Systemen (McDonald und Murrell, 1995; Miguez *et al.*, 1997) in folgender Hinsicht von Vorteil. Während der Einsatz zur spezifischen Amplifikation von *mmoX*-Genen aus Umwelt-DNA von Reisswurzeln mit einem von McDonald und Murrell (1995) beschriebenen Nachweissystem nicht möglich war, konnte mit dem neuen *mmoX*-Nachweissystem ein Amplikon mit der zu erwartenden Fragmentgröße erzielt werden. Aufgrund der Größe des amplifizierten *mmoX*-Abschnittes (865 Bp [Großkopf, 1994] versus 535 Bp [McDonald und Murrell, 1995] versus 369 Bp [Miguez *et al.*, 1997]) lag zudem ein größerer Sequenzdatensatz zur Verrechnung der evolutionären Verwandtschaftsverhältnisse von *mmoX* zwischen Umweltklonen und Reinkulturen vor (Abb. 6). Die Anwendbarkeit von „*mmoX*“ für molekular-ökologische Untersuchungen wird zudem durch die Identifikation des Klones M84-S38, welcher phylogenetisch eine neue Linie darstellt, hervorgehoben (siehe auch V.2.6). Dies zeigt, daß mit dem Nachweissystem „*mmoX*“ auch solche Umweltsequenzen erfaßt werden, die nicht unmittelbar mit *mmoX*-Genen der klassischen *Methylocystis/Methylosinus*-Entwicklungslinie verwandt sind.

2.5 T-RFLP-Profile auf Basis von „*pmoA*“

Die Erstellung von Klonbibliotheken und nachfolgend die vergleichende Sequenzanalyse von *pmoA*-Genen lieferte detaillierte Einblicke in die Diversität von methanotrophen Populationen. Für den Vergleich verschiedener Habitats sowie die Untersuchung der räumlichen oder zeitlichen Veränderung in der strukturellen Zusammensetzung von MAB ist diese Methode allerdings nicht aussagekräftig. Die generierte *pmoA*-Datenbank von 24 Reinkulturen und 78 Umweltsequenzen ermöglichte es, das Potential einer *pmoA*-gestützten T-RFLP-Analyse zu evaluieren. Als Untersuchungsmodell diente das zuvor mit verschiedenen Genmarkern gut charakterisierte Habitat der Reisswurzel. Die T-RFLP-Analyse mit *MspI* als Restriktionsenzym erzeugte Profile, mit denen die drei phylogenetisch definierten Gruppen von CH₄-Verwertern (Typ-I-MAB [*γ-Proteobacteria*], Typ-II-MAB [*α-Proteobacteria*] und AAOB [*β-Proteobacteria*]) voneinander abgegrenzt werden konnten. Darüber hinaus führte diese Technik zu einer Feinauflösung der Typ-I-MAB. Dies ermöglichte die Detektion der *pmoA*-Cluster I bis III (80-Bp T-RF, 440-Bp T-RF und 531-Bp

T-RF) sowie zwei weiterer T-RFs (350 Bp für *Methymicrobium album* und 505 Bp für *Methylobacter* sp BB.1). *pmoA*-Sequenztypen korrespondierend zu den letzteren beiden Organismen wurden jedoch nicht über die Klonbibliotheken nachgewiesen, obwohl die PCR-Produkte für beide molekulare Techniken von den gleichen Umweltproben stammten. Dies deutet entweder auf eine methodisch-bedingte Verzerrung durch Klonierung oder auf eine unzureichende Stichprobenzahl der analysierten Klone hin. Gerade dieser Aspekt hebt aber den methodischen Stellenwert der *MspI*-T-RFLP-Analyse von *pmoA*-Genen hervor. Diese Technik liefert ein exaktes quantitatives Maß für die Zusammensetzung verschiedener Sequenztypen in einem PCR-Produkt. Ein weiteres gutes Beispiel hierfür ist das für Typ-II-Organismen spezifische 245-Bp T-RF, dessen Fluoreszenzintensität in Abb. 5B (35,4% für Probe M84) einen wesentlich höheren Anteil dieser Organismen-Gruppe im PCR-Produkt anzeigt, als man aufgrund der geringen Anzahl vorgefundener Klone (zwei von 47 analysierten Klonen) annehmen würde (Abb. 4). Unter der Voraussetzung, daß keine starken Verzerrungen während der DNA-Extraktion und PCR-vermittelter Amplifikation stattfinden, sind *pmoA*-T-RFLP-Profile geeignet, die strukturelle Zusammensetzung methanotropher Populationen weitgehend zu reflektieren. Dies kann nicht für die Detektion von *amoA*-Genen mit dem *pmoA*-Nachweissystem angenommen werden, da die Primer mit der korrespondierenden *amoA*-Region bei einer Reihe von AOB-Reinkulturen Fehlpaarungen aufweisen (Purkhold *et al.*, 2000).

Die T-RFLP-Analyse der Wurzeln aller drei untersuchter Mikrokosmen (M70, M84, M90, Abb. 5B bis D) zeigten weitgehend gleiche T-RF-Profile mit vergleichbaren relativen Abundanzen der T-RFs von 80 Bp, 245 Bp, 350 Bp, 440 Bp und 505 Bp. Lediglich die relative Abundanz des 531-Bp T-RFs (*pmoA*-Cluster II) unterlag größeren Variationen. Die Ursache dieser Schwankung könnte methodisch bedingt sein. Sie kann aber auch in dem unterschiedlichen Alter der verglichenen Reispflanzen oder in den verschiedenen Jahrgängen der Reisböden begründet liegen. Im großen und ganzen läßt sich aber sagen, daß in allen drei Mikrokosmen eine vergleichbare Zusammensetzung wurzelassoziierter, methanotropher Populationen über die *pmoA*-gestützte T-RFLP-Analyse nachgewiesen werden konnte. Durch den Erhalt ähnlicher T-RF-Profile wird somit die hohe Reproduzierbarkeit dieser „Fingerprinting“-Technik belegt.

2.6 Neue *pmoA*- und *mmoX*-Entwicklungslinien an Reisswurzeln

Auf Basis des *pmoA*-Nachweissystems wurden Sequenztypen detektiert, die drei neue Entwicklungslinien mit keiner klaren phylogenetischen Zuordnung zu bekannten Gruppen an MAB oder AAOB bilden (Linien A bis C, Abb. 4). Durch die getrennte Verrechnung der 5'- und 3'-Hälften der entsprechenden Sequenzen ergaben sich keinerlei Hinweise darauf, daß es sich um mögliche chimäre Moleküle handelte. Der Ähnlichkeitswert der jeweiligen

Proteinsequenz zu den nächsten ähnlichen *pmoA*- oder *amoA*-Sequenzen betrug für Linie A 69% zu Typ-II-MAB, für Linie B 55% zu AAOB und für Linie C 49% zu AAOB. Diese Werte liegen im Bereich an Ähnlichkeit, der zwischen den *pmoA*-Genen von Typ-I- und Typ-II-MAB (von 59% bis 66%) und *amoA* und *pmoA* (48% bis 53% [zu *pmoA* von Typ-I-MAB] und 44% - 46% [zu *pmoA* von Typ-II-MAB]) liegt. In Analogie zu einem von Holmes *et al.*, (1999) beschriebenen Verfahren wurden für die jeweiligen Proteinsequenzen mutmaßliche Signaturpositionen identifiziert, die entweder universell bei *pmoA* und *amoA*-Genen auftraten oder spezifisch für entweder *pmoA*-Gene oder *amoA*-Gene waren. Mit dem Vergleich von mutmaßlichen Signaturpositionen leiteten Holmes *et al.* (1999) die Präsenz einer bislang unbekannten methanotrophen Gruppe aus neu entdeckten Umweltsequenzen ab (Tab. 8).

Tabelle 8

Anzahl der Aminosäure-Signaturen innerhalb eines Bereiches von 165 Aminosäurepositionen der Gene kodierend für *pmoA* und *amoA*. Aminosäuren wurden als mutmaßliche Signaturpositionen betrachtet, wenn sie zwei Kriterien erfüllten: 1. Die Positionen mußten in allen *pmoA*-Genen von Typ-I- und Typ-II-MAB konserviert sein (= mutmaßliche MMO Signaturpositionen¹), und 2. alle *amoA*-Sequenztypen mußten an den gleichen Positionen ebenfalls eine konservierte aber andere Aminosäure haben (= mutmaßliche AMO Signaturpositionen²). 21 Aminosäurepositionen erfüllten diese Kriterien.

³52 Aminosäurepositionen, die sowohl für *pmoA* als auch *amoA* universell konserviert sind.

⁴Die Klonsequenzen aus Waldboden stellen ein distinktes Cluster an *pmoA*-Umweltsequenzen dar (RA14, Pantanal13, Rold1, Rold5 and Maine6 [Abb. 3]). Die Werte wurden Holmes *et al.*, (1999) entnommen.

Sequenztypen	MMO ¹ 21	AMO ² 21	universell ³ 52
Linie A	17 (81 %)	1 (5 %)	49 (94 %)
Linie B	7 (33 %)	4 (19 %)	43 (83 %)
Linie C	9 (43 %)	6 (29 %)	40 (77 %)
Klone (Waldboden) ⁴	16 (76 %)	2 (10 %)	49 (94 %)

Der Vergleich der Aminosäuresignaturen der jeweiligen Entwicklungslinien läßt die Schlußfolgerung zu, daß Linie A eine neue Gruppe an MAB repräsentiert. Diese Hypothese wird auch durch die Tatsache gestützt, daß ein Großteil der 21 Signaturpositionen in einer Region des Proteins lokalisiert ist, die zum katalytischen Zentrum des Enzyms gehört (nachgewiesen für AMO, Vannelli *et al.*, 1996). Der geringe Anteil an MMO-spezifischen oder AMO-spezifischen Signaturen der Linien B und C (Tab. 8) läßt eine eindeutige Zuordnung dieser Sequenzen zu *pmoA* oder *amoA* nicht zu. Beide Linien besitzen aber einen relativ hohen Anteil an universellen Signaturen (83% für Linie B und 77% für Linie C).

Die hohe Anzahl an universell konservierten Aminosäurepositionen und die Tatsache, daß Datenbankvergleiche *pmoA*- bzw. *amoA*-Sequenztypen als die nächstverwandten Gene aufzeigten, läßt vermuten, daß die Linien B und C bislang uncharakterisierte Monooxygenasen repräsentieren.

Auf Basis des *mmoX*-Nachweissystems wurde ein Sequenztyp ermittelt (Klon M84-S38), welcher nicht in das kohärente Cluster der *Methylosinus/Methylocystis*-Gruppe fiel, sondern einen gemeinsamen Entwicklungsast mit der *mmoX* von *Methylocella palustris* aufwies (Abb. 6). Die Ähnlichkeitswerte auf Basis der abgeleiteten Aminosäuresequenz betrug zur *mmoX* von *Methylocella palustris* 84,3%, zu *mmoX* der *Methylosinus/Methylocystis*-Gruppe 81,5 - 82,9% und zu *mmoX* von *Methylococcus capsulatus* Bath 82,5%. Die Ähnlichkeit der *mmoX* zweier distinkter Typ-I-MAB (*Methylococcus capsulatus* Bath und *Methylomonas* sp. KSWIII [Shigematsu *et al.*, 1999]) beträgt 88,7% auf Proteinebene. Unter Berücksichtigung dieser Ähnlichkeitswerte wäre es möglich, daß Klon M84-S38 zu einer bisher unbekannten Gruppe der MAB korrespondiert und nicht einen *Methylocella palustris*-ähnlichen methanotrophen Organismus repräsentiert.

2.7 Ökologische Bedeutung der Diversität von MAB an Reiswurzeln

PLFA-Profile (Phospholipid-Fettsäuremuster) sowie DGGE-Analysen auf Basis von 16S rDNA zeigten ein zunehmendes Auftreten von Typ-I-MAB in der Rhizosphäre von gefluteten Reis-Mikrokosmen nach NH₄-Düngung (Bodelier *et al.*, 2000). Auch im ungedüngten Rhizosphäre-Boden konnten über 16S rDNA-gestützte DGGE-Analysen die Präsenz von Typ-I-MAB gezeigt werden, nicht aber im undurchwurzelter, anoxischen Reisfeldboden. Daraus wurde geschlußfolgert, daß neben Ammoniak die Reispflanze selbst ein essentieller Faktor für das Wachstum der Typ-I-Organismen darstellt (Bodelier *et al.*, 2000). Die Tendenz einer zunehmenden Anzahl von Typ-I-MAB in Reiswurzelnähe wurde durch den Vergleich der extrahierten Gesamt-DNA des undurchwurzelter, anoxischen Reisfeldbodens mit der Reiswurzel über *pmoA*-gestützte T-RFLP-Analysen bestätigt (Abb. 5). Eine eindeutig höhere Abundanz und Diversität der Typ-I-MAB-spezifischen T-RFs findet sich an den Reiswurzelproben (Abb. 5B bis D) gegenüber dem undurchwurzelter Boden (Abb. 5A). Des weiteren indizierte der Erhalt von ribosomaler RNA von Typ-I-Organismen an der Wurzel, daß es sich um aktive Populationen handeln muß. Die Identifikation metabolisch aktiver Typ-I-MAB an Reiswurzeln und ihre Abwesenheit im undurchwurzelter Boden kann als Evidenz gewertet werden, daß die Reispflanze die Proliferation von Typ-I-MAB entscheidend beeinflußt.

Während also das Auftreten von Typ-I-Gruppen räumlichen und zeitlichen Schwankungen zu unterliegen scheint, sind Typ-II-MAB in den Kompartimenten Rhizosphäre-Boden und undurchwurzelter Boden in weitgehend konstanten Mengen

nachweisbar (Bodelier *et al.*, 2000; Henckel *et al.*, 1999, 2000). Dies könnte in der Fähigkeit vieler *Methylocystis*- und *Methylosinus*-Arten liegen Überdauerungsstadien zu bilden, welche gegen Austrocknung resistent sind (Bildung von Cysten und Exosporen [Whittenbury 1970]). Eine weiterer selektiver Vorteil der Typ-II-MAB liegt darin, unter anaeroben Bedingungen in Form von vegetativen Zellen zu überleben (Roslev and King, 1994, 1995). Auf diese Weise können sie die für sie ungünstigen Bedingungen im überfluteten Reisfeldboden überstehen, um dann unmittelbar nach der Entwässerung wieder aktiv zu werden. Darüber hinaus können eine Vielzahl von Typ-II-MAB molekularen Stickstoff fixieren, was sie weniger empfindlich gegen NH_4 -Mangel im Habitat macht. Diese Aspekte dürften der Grund sein, warum in vielen experimentellen Studien ein persistentes Vorkommen von Typ-II-MAB in den verschiedenen Reisboden-Kompartimenten festgestellt wurde (Effekt von NH_4 -Düngung [Bodelier *et al.*, 2000], Drainage-Experimente mit Reisfeldboden [Henckel *et al.*, 2000a], Inkubationsexperimente mit CH_4 oder mit unterschiedlichen CH_4/O_2 -Mischungsverhältnissen ([Henckel *et al.*, 1999; Henckel *et al.*, 2000b])). Im Gegensatz dazu kann angenommen werden, daß die meisten Typ-I-MAB den periodisch bedingten Substratmangel oder den Mangel an O_2 bzw. NH_4 im Reisfeldboden nicht überleben und daher nur in unmittelbarer Assoziation zur Pflanzenwurzel existieren können. Diese Beobachtungen stimmen mit der Hypothese überein, daß Typ-I-MAB bevorzugt an Standorten zu finden sind, welche ein schnelles Wachstum von methanotrophen Organismen ermöglichen, wohingegen Typ-II-MAB bevorzugt an den Stellen zu finden sind, wo Wachstum periodisch nur beschränkt möglich ist (Vecherskaya *et al.*, 1993; Hanson und Hanson, 1996).

Ein weiterer interessanter Aspekt im Vergleich zwischen den Standorten Reisfeldboden und Reisswurzel ist die unterschiedliche Diversität an Typ-I-MAB, die mit kultivierungsunabhängigen Techniken nachgewiesen wurde. 16S rDNA-gestützte DGGE-Analysen des Rhizosphärebodens führten zum Nachweis nur eines distinkten Clusters, zugehörig der Gattung *Methylobacter* (Bodelier *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu zeigten die in dieser Arbeit erzielten Sequenzdaten und T-RFLP-Profile eine beträchtlich höhere Diversität von Typ-I-MAB an der Reisswurzel an. Dies umfaßte Sequenztypen, welche zu den Gruppen *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylomicrobium*, *Methylococcus* und einer neuen Entwicklungslinie innerhalb der Typ-I-MAB (*pmoA*-Cluster II) gehörten. Die hohe Zahl distinkter methanotropher Populationen, die die Reisswurzel besiedeln, sowie der Erhalt von neuen *pmoA*- und *mmoX*-Sequenztypen (Linie A und Klon M84-S38 [siehe auch V.2.6]) spiegelt möglicherweise die hohe Zahl ökologischer Mikronischen an der Reisswurzel wider. Diese dürften durch räumlich-zeitliche Variationen in den Mischungsverhältnissen von CH_4 und O_2 (Amaral und Knowles, 1995; Henckel *et al.*, 2000a) oder in der Verfügbarkeit von Stickstoffquellen (Graham *et al.*, 1993; Bodelier *et al.*, 2000) definiert sein.

3. Molekulare Charakterisierung von MAB in Wiesenböden

In Wiesenböden können unter anaeroben Bedingungen große Mengen an CH₄ gebildet werden. Unter aeroben Bedingungen wird sowohl das im Boden gebildete CH₄ als auch atmosphärisches CH₄ oxidiert (Segers, 1998; Van den Pol-van Dasselaar, 1998). In vielen Umweltstudien wurden die Faktoren untersucht, die einen Einfluß auf die CH₄-Oxidation in landwirtschaftlich genutzten Böden und Wiesenböden haben. Darunter gehören die Bodentemperatur (Czepiel *et al.*, 1995; Dobbie *et al.*, 1996), der Wassergehalt des Bodens (Czepiel *et al.*, 1995; Jarvis *et al.*, 1994), der pH-Wert des Bodens (Hütsch *et al.*, 1994), die Art der landwirtschaftlichen Nutzung (Mosier *et al.*, 1991; Hütsch *et al.*, 1994) und die Verfügbarkeit von Stickstoffquellen (Hütsch *et al.*, 1994; Willison *et al.*, 1996). Das Vorkommen und die Diversität der für die CH₄-Oxidation in Wiesenböden verantwortlichen Mikroorganismen wurde jedoch bislang nicht beschrieben. In diesem Versuchsteil sollten daher erste molekulare Daten zur Charakterisierung der methanotrophen Lebensgemeinschaft eines Wiesenbodens erhoben werden. Als zentraler Genmarker wurde auch hier das Nachweissystem „*pmoA*“ für die Erstellung von T-RFLP-Profilen und DGGE-Bandenmustern eingesetzt. 16S rDNA-basierende DGGE-Analysen sollten zusätzliche Aufschlüsse über die methanotrophe Lebensgemeinschaft geben. Die Ergebnisse zeigten, daß ein starker saisonaler Unterschied in den mit verschiedenen Genmarkern erfaßbaren Populationen bestand.

3.1 *pmoA*-gestützte T-RFLP und DGGE-Analysen

Die vergleichende Sequenzanalyse der aus der Wiesenboden (Winterprobe) erzielten DGGE-Banden führte zum Nachweis zweier Sequenzen (= „*pmoA*-DGGE-Linie“) mit naher Verwandtschaft zu Klonsequenzen, die aus einer methanotrophen Anreicherung erzielt worden waren. Die Anreicherung war mit Material aus einem sauren Torfmoor Westsibiriens inokuliert worden (Dedysh, unveröffentlicht). Diese Sequenzen bilden eine separate Entwicklungslinie, die gemeinsam mit einem neu beschriebenen *pmoA*-Cluster (Klonsequenzen aus Waldböden [Holmes *et al.*, 1999; Henckel *et al.*, 2000]) im Stammbaum abzweigen (Abb. 11). Die Ähnlichkeit der Sequenztypen der „*pmoA*-DGGE-Linie“ zu *pmoA* der *Methylocystis*/*Methylosinus*-Gruppe liegt in einem Bereich von 69,5 bis 72% auf Proteinebene. Die Sequenzähnlichkeit der „*pmoA*-DGGE-Linie“ zu dem neuen Cluster der aus Waldböden erzielten Umweltsequenzen reicht von 80 - 81%. Da in den entsprechenden Waldböden atmosphärische CH₄-Oxidation gemessen wurde, diskutierten

die Autoren (Holmes *et al.*, 1999; Henckel *et al.*, 2000) einen möglichen Zusammenhang zwischen den detektierten *pmoA*-Sequenzen und der Existenz bislang uncharakterisierter Mikroorganismen mit der Befähigung, atmosphärisches CH₄ zu oxidieren. Wie in Abschnitt V.2.6 gezeigt wurde, ergab sich aufgrund der hohen Anzahl an *pmoA*-Signaturpositionen eine weitere Evidenz dafür, daß sich die in Waldböden detektierten Umweltsequenzen von Genen ableiten, die für Enzyme mit CH₄ als Substrat kodieren. Die relativ nahe Gruppierung der „*pmoA*-DGGE-Linie“ (aus Wiesenboden) zu den mutmaßlichen *pmoA*-Sequenzen aus Waldboden läßt daher vermuten, daß diese sich ebenfalls von bislang uncharakterisierten MAB ableiten.

Die Inkubation des Sommerbodens mit CH₄ wurde durchgeführt, um ein Wachstum von MAB zu stimulieren, da es nicht möglich war, *pmoA* aus direkt extrahierter Gesamt-DNA des Sommerbodens zu amplifizieren. Der Verlauf der CH₄-Oxidation in Abb. 10 ließ auf ein Wachstum von MAB schließen. Tatsächlich konnte die aus dem Boden nach CH₄-Inkubation extrahierte Gesamt-DNA amplifiziert werden. Bei dem Kontroll-Experiment, in dem derselbe Boden ohne CH₄ inkubiert worden war, konnte kein *pmoA*-Signal erzielt werden, was eine zusätzliche Evidenz für die Korrelation zwischen CH₄-Verbrauch und MAB-Wachstum darstellt. Durch die CH₄-Inkubation erfolgte jedoch keine selektive Anreicherung solcher MAB, welche zu der neu detektierten „*pmoA*-DGGE-Linie“ korrespondierten. Die sequenzierten DGGE-Banden der Sommerprobe gruppieren vielmehr zu bekannten Organismen innerhalb der Typ-I-MAB, Typ-II-MAB oder AAOB (Abb. 11). Die über DGGE-Analyse gewonnenen Sequenzdaten und die daraus ableitbaren T-RFs stimmten dabei exakt mit den erstellten T-RFLP-Profilen überein. Somit lieferten die genetischen „Fingerprinting“-Methoden (T-RFLP-Analyse und DGGE-Analyse) auf Basis von *pmoA* übereinstimmende Resultate (Abb. 11A bis C). Dies trifft auch hinsichtlich der relativen Abundanz des *Methylobacterium album*-verwandten Sequenztyps zu, der sowohl in der DGGE-Analyse als auch in der T-RFLP Analyse den größten Anteil im PCR-Produkt ausmachte. Die Anreicherung des zu Typ-I-gehörenden Organismus reflektiert möglicherweise den bereits unter V.2.7 diskutierten Aspekt, daß Typ-I-MAB schneller auf Milieuänderungen (von Substratmangel zum Substratüberschuß) reagieren können als Typ-II-MAB. Zum anderen spiegelt das einfache Inkubationsexperiment auch die Tendenz wider, daß viele Standard-Kultivierungstechniken artifizielle Systeme darstellen, in denen immer die gleichen (bekannten) Gruppen an Mikroorganismen angereichert werden.

Die Anreicherung von Typ-I-MAB belegt allerdings ihre Anwesenheit im Inokulum, wenn auch vielleicht nur in geringer Abundanz. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Abundanz von MAB im Sommer gegenüber der Winterprobe möglicherweise aufgrund von Substratmangel stark zurückgegangen war. Diese Überlegung wird durch die Beobachtung unterstützt, daß Bodenproben, die im Sommer entnommen worden waren, wesentlich

weniger CH₄ produzierten als die im Winter entnommenen Bodenproben (P. Dunfield, persönliche Mitteilung). Aufgrund der beobachteten Populationsdynamik wäre es daher sinnvoll die Veränderungen in der Struktur der methanotrophen Lebensgemeinschaft im Wiesenboden in definierten Zeitintervallen (z.B. monatlich) zu verfolgen.

3.2 DGGE-Analysen mit dem 16S rDNA-Nachweissystem „9α“

Um weitere Informationen über Typ-II-MAB im Wiesenboden zu erhalten, wurde das 16S rDNA-Nachweissystem „9α“ eingesetzt. Die Anwendung von „9α“ erfolgte bereits in vorhergehenden DGGE-Analysen zur Charakterisierung von Reisfeldboden (Henckel *et al.*, 1999, 2000a, 2000; Bodelier *et al.*, 1999). In diesen Analysen gruppierte der Großteil der erzielten 16S rDNA-Sequenztypen innerhalb der *Methylosinus/Methylocystis*-Gruppe. Bei der Anwendung des „9α“-Nachweissystems zur Untersuchung des Wiesenbodens (sowohl Sommer als auch Winter) stellte sich hingegen heraus, daß zwar alle sequenzierten DGGE-Banden als ein kohärentes Cluster (= „16S rDNA-DGGE-Cluster“) in die Gruppe der α -*Proteobacteria* fielen, jedoch nicht innerhalb der *Methylosinus/Methylocystis*-Gruppe (Abb. 12). Darüber hinaus bestand keine nahe Verwandtschaft zu nicht-methanotrophen Vertretern innerhalb der α -*Proteobacteria*. Die phylogenetische Zuordnung war deswegen problematisch, da die DGGE-Banden lediglich eine Größe von 391 Bp hatten. Eine phylogenetische Verrechnung von partiellen Sequenzdaten kann nur als vertrauenswürdig angesehen werden, wenn diese eine hohe Verwandtschaft zu bekannten Organismen haben (Hugenholtz *et al.*, 1998; Ludwig *et al.*, 1998). Um den Befund also zu verifizieren wurde ein 1008 Bp großes Fragment von 16S rRNA-Genen („MethT2“, Tab. 4, Wise *et al.*, [1999]), aus der Winterprobe amplifiziert, kloniert und sequenziert. Die hohe Verwandtschaft zwischen den Klonsequenzen O2T2-6, 10, 14, und 30 und den Sequenzen des „16S rDNA-DGGE-Clusters“ belegt die Vertrauenswürdigkeit des 16S DNA-Stammbaums (Abb. 12) im Hinblick auf die korrekte Topologie des „16S rDNA-DGGE-Clusters“ innerhalb der α -*Proteobacteria*. Wise *et al.*, (1999) beschrieben das Nachweissystem „MethT2“ als hochspezifisch für Typ-II-MAB innerhalb der α -*Proteobacteria*. Tatsächlich wurden mit diesem System bekannte Typ-II-MAB über Klonbibliotheken an der Reisswurzels detektiert (M. Tchawa, persönliche Mitteilung). Da aber zwei unabhängige Nachweissysteme („9α“ und „MethT2“) nicht zur Detektion von *Methylosinus* bzw. *Methylocystis* spp. im Wiesenboden führten, ist anzunehmen, daß diese Organismengruppen in nur geringer Abundanz an dem untersuchten Standort vorkommen.

Ein Nachteil der auf 16S rDNA-Daten basierenden Diversitätsanalysen von Mikroorganismen ist die Tatsache, daß aus den gewonnenen Sequenzinformationen keinerlei Rückschlüsse über mögliche physiologische Charakteristika oder ökologische Funktionen der detektierten Organismen gemacht werden können. In begrenzter Weise ist

dies nur dann möglich, wenn eine 16S rDNA-Sequenz eindeutig in eine phylogenetisch definierte Gruppe fällt, in der alle Organismen durch das Vorhandensein gemeinsamer physiologischer Eigenschaften charakterisiert sind (z.B. die kohärente Gruppe der *Methylosinus/Methylocystis*-Gruppe = Typ-II-MAB). Dies ist bei den durch „9α“ und „MethT2“ nachgewiesenen Sequenzen aber nicht der Fall. Dennoch zeigt die Stammbaumtopologie in Abb. 12 eine bemerkenswerte Gruppierung des „16S rDNA-DGGE-Clusters“. Dieses ist im Stammbaum von zwei weiteren Sequenz-Clustern eingeschlossen, von denen das eine die „klassische“ *Methylosinus/Methylocystis*-Gruppe darstellt und das andere durch den methanotrophen Organismus *Methylocella palustris* sowie weiteren nicht-methanotrophen Organismen (wie *Beijerinia indica* und *Rhodopseudomonas acidophila*) charakterisiert wird. Mit ungefähr gleicher phylogenetischer Distanz und mit einem gemeinsamen Knotenpunkt gruppierte das „16S rDNA-DGGE-Cluster“ zusammen mit den beiden oben genannten Gruppen. Es besteht also eine deutliche Abgrenzung dieser drei monophyletischen Gruppen (von denen zwei Gruppen methanotrophe Organismen enthalten) zu allen anderen nicht-methanotrophen Organismen der α -*Proteobacteria*. Der zweite wichtige Aspekt ist, daß Sequenztypen, die in das „16S rDNA-DGGE-Cluster“ fielen, vermehrt in der Sommerprobe nach CH₄-Inkubation, jedoch kaum in der Sommerprobe ohne CH₄-Inkubation nachzuweisen waren (Abb. 12B). Dies könnten indirekte Hinweise für einen methanotrophen Phänotyp sein, der zu den Umweltsequenzen des „16S rDNA-DGGE-Clusters“ korrespondiert.

3.3 DGGE-Analysen mit dem 16S rDNA-Nachweissystem „10γ“

Die Analyse mit dem Nachweissystem „10γ“ ließ vermuten, daß Typ-I-MAB keine große Rolle in dem untersuchten Habitat spielten. Wiederum formten alle DGGE-Banden (Sommer und Winter) ein distinktes Cluster, jedoch ohne klare Zuordnung zu bekannten Organismen und außerhalb der kohärenten Entwicklungslinie der Typ-I-MAB. Nachdem der Boden der Sommerprobe mit CH₄ inkubiert worden war, konnte aber der bereits über „*pmoA*“ erhaltene Befund bestätigt werden, daß *Methylobacterium album*-verwandte Organismen angereichert worden waren. Das „10γ“-System wurde benutzt, da es bereits erfolgreich in DGGE-Analysen eingesetzt worden war (Henckel *et al.*, 1999, 2000a). Der spezifische 5'-Primer wurde jedoch vor zehn Jahren formuliert (Tsien *et al.*, 1990), und ein aktueller Vergleich mit den derzeit öffentlich verfügbaren 16S rDNA-Sequenzen zeigte, daß der 5'-Primer des „10γ“-Systems bei einigen Organismen der Typ-I-MAB Fehlpaarungen besitzt, die möglicherweise dadurch nicht detektiert wurden. Eine zusätzliche Evaluierung über das mögliche Vorkommen von Typ-I-MAB im Wiesenboden wäre daher über Klonierung und Sequenzierung auf Basis des hochspezifischen Nachweissystems „MethT1A“ (Wise *et al.*, 1999) sinnvoll.

4. Abschließende Betrachtung des kombinierten molekularen Konzepts zur Charakterisierung von MAB

Der Vergleich der durch das „*pmoA*“-Nachweissystem erhaltenen Ergebnisse mit den Daten der Nachweissysteme „*mmoX*“, „*mxoF*“ und der 16S rDNA/rRNA-basierenden PCR-Systeme bestätigte, daß die *pmoA* ein exzellenter Genmarker für die kultivierungsunabhängige Charakterisierung der Diversität von CH₄-verwertenden Bakterien darstellt. Die Daten zeigen aber auch, daß ein umfassender Einblick in die strukturelle Zusammensetzung methanotropher Populationen nur durch den kombinierten Einsatz mehrerer Genmarker und verschiedenen molekularer Techniken (Klonierung, vergleichende Sequenzanalyse, molekulare "Fingerprinting"-Methoden) gewährleistet ist. Die *pmoA*-gestützte T-RFLP-Analyse bewährte sich als ein geeignetes diagnostisches Instrument, um die Komplexität methanotropher Populationen aufzuzeigen. Zusammengefaßt kann man sagen, daß eine außerordentlich hohe Diversität von Typ-I- und Typ-II-MAB detektiert wurde und daß eine Reihe definierter Typ-I-Populationen spezifisch für den Standort Reisswurz zu sein scheint. Die Evaluierung der T-RFLP-Technik erfolgte gleichzeitig durch eine auf *pmoA* basierende DGGE-Analyse (Abb. 4B und C) von MAB an der Reisswurz. Beide *pmoA*-"Fingerprinting"-Techniken zeigten, daß Organismen aus dem *pmoA*-Cluster III (*Methylococcus capsulatus*-verwandte Sequenzen) und Typ-II-Organismen (*Methylocystis* sp. M-verwandte Sequenzen) die abundanten MAB an der Reisswurz sind. Der Vergleich beider Techniken zeigt aber auch, daß die Auflösung über T-RFLP wesentlich höher war, während die genetische Diversität von MAB mit Hilfe von DGGE nur unvollständig erfaßt wurde. Zu ähnlichen Resultaten führte auch ein von Moeseneder *et al.*, (1999) durchgeführter Vergleich zwischen T-RFLP-Analysen und DGGE. Bei der Untersuchung der 16S rRNA-Gene komplexer Lebensgemeinschaften von marinem Bakterioplankton wurde von Moeseneder *et al.* (1999) gezeigt, daß im Vergleich zur DGGE-Analyse die T-RFLP-Analyse eine wesentlich höhere Auflösung der mikrobiellen Diversität ermöglicht. Die Erfassung der gesamten mikrobiellen Diversität (einschließlich Sequenztypen, welche in nur geringen Mengen zu detektieren sind) ist jedoch aus zweierlei Gründen für molekular-ökologische Umweltstudien von Bedeutung: Zum einen kann die tatsächliche Abundanz „seltener“ Gensequenzen in der Natur viel höher sein, da methodenbedingte Verzerrungen (z. B. durch PCR) nicht ausgeschlossen werden können. Zum anderen sagt die Tatsache, daß bestimmte Organismen in vergleichsweise geringer Anzahl vorkommen, nichts über ihre tatsächliche ökologische Bedeutung in einem bestimmten Habitat aus. So können sich verändernde Milieubedingungen einen raschen Anstieg der vormals unterrepräsentierten Organismen und somit eine Veränderung in der

Zusammensetzung der bakteriellen Lebensgemeinschaft bewirken („genetisches Reservoir“).

Die Besonderheit der T-RFLP-Methode ist insbesondere dadurch gegeben, daß sie im Gegensatz zu anderen „Fingerprinting“-Methoden (wie DGGE, TGGE, SSCP) „Fingerprint“-Muster erzeugt, die direkte phylogenetische Ableitungen ermöglichen. Diese Korrelation zwischen T-RFs und phylogenetischer Information ist jedoch nicht in allen Fällen gegeben, da Organismen, welche verschiedenen monophyletischen Gruppen angehören, durch das gleiche T-RF charakterisiert sein können (siehe auch T-RFLP-Analyse auf Basis von *amoA*: V.1.3). Daher erscheint die Ergänzung von T-RFLP-Analysen durch DGGE mit anschließender Sequenzierung sinnvoll. Dies konnte auch bei der Charakterisierung des Wiesenbodens gezeigt werden. Die alleinige Deutung des T-RFs der Größe von 80 Bp (ohne Sequenzierung der DGGE-Banden) hätte aufgrund der vorliegenden Sequenzinformationen irrtümlicherweise auf *Methylococcus capsulatus*-verwandte Organismen schließen lassen. Die theoretische Ableitung aus bestehenden Sequenzdaten kann also nicht alleiniges Kriterium für die Interpretation erstellter T-RFLP-Profile sein. Eine zusätzliche Evaluierung durch Einbeziehung von neuen Sequenzdaten ist deswegen erforderlich. Auch wenn die Erstellung von Klonbibliotheken für Umwelt-Analysen eine große Bedeutung hat, so wird sie dennoch dem Anspruch einer zeitlich effizienten Analyse von mikrobiellen Populationen nicht gerecht. Dagegen erlaubt die kombinierte Anwendung von DGGE und T-RFLP-Analyse einen hohen Probendurchsatz, wodurch der Vergleich zwischen verschiedenen mikrobiellen Lebensgemeinschaften ermöglicht wird.

VI. Literaturverzeichnis

Amann, R., W. Ludwig und K.-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169.

Auman, A.J., S. Stolyar, A.M. Costello, und M.E. Lidstrom. 2000. Molecular characterization of methanotrophic isolates from freshwater lake sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5259-5266.

Amaral, J.A. und R. Knowles. 1995. Growth of methanotrophs in methane and oxygen counter gradients. *FEMS Microbiol. Lett.* **126**: 215-220.

Aviv, M., H. Giladi, A.B. Oppenheim und G. Glaser. 1996. Analysis of the shut-off of ribosomal RNA promoters in *Escherichia coli* upon entering the stationary phase of growth. *FEMS Microbiol. Lett.* **140**: 71-76.

Bedard, C. und R. Knowles. 1989. Physiology, biochemistry and specific inhibitors of CH₄, NH₄ and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiol. Rev.* **53**: 68-84.

Bock, E., R. Atueven, R. Mansch und M Vollmer. 1994. Formation and consumption of nitric oxide by nitrifying bacteria. In: Alberghina, L., L. Frontali und P. Sensi (Hrsg.), ECB6: Proceedings of the 6th European Congress on Biotechnology. S. 241-244. Elsevier Science B.V., Amsterdam.

Bodelier, P.L.E., P. Roslev, T. Henckel und P. Frenzel. 2000. Stimulation by ammonium-based fertilizers of methane oxidation in soil around rice roots. *Nature.* **403**: 421-424.

Bornemann, J. und E.W. Triplett. 1997. Molecular microbial diversity in soils from eastern amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2647-2653.

Bosse, U., und P. Frenzel. 1997. Activity and distribution of methane-oxidizing bacteria in flooded rice soil microcosms and in rice plants (*Oryza sativa*). *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1199-1207.

- Bothe H., G. Jost, M. Schlöter, B.B. Ward und K.-P. Witzel.** 2000. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 673-690.
- Bowman, J.P., L.I. Sly, P.D. Nichols und A.C. Hayward.** 1993. Revised taxonomy of the methanotrophs: description of *Methylobacter* gen. nov., emendation of *Methylococcus*, validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* species, and a proposal that the family *Methylococcaceae* includes only the group I methanotrophs. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 735-753.
- Bratina, B.J., G.A. Brusseau und R.S. Hanson.** 1992. Use of 16S rRNA analysis to investigate phylogeny of methylotrophic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 645-648.
- Bruce, D.** 1997. Analysis of *mer* gene subclasses within bacterial communities in soils and sediments resolved by fluorescent-PCR-restriction fragment length polymorphism profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4914-4919.
- Cardy, D.L.N., V. Laidler, G.P.C. Salmond und J.C. Murrell.** 1991. Molecular analysis of the methane monooxygenase (MMO) gene cluster of *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Mol. Microbiol.* **5**: 335-342.
- Cicerone, R.J. und R.S. Oremland.** 1988. Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Global Biogeochem. Cycles* **2**: 299-327.
- Conrad, R.** 1997 Production and consumption of methane in the terrestrial biosphere. *In*: Helas, G, J. Slanina und R. Steinbrecher (Hrsg.), SBP Academic Publ., Amsterdam.
- Conrad, R. und F. Rothfuss.** 1991. Methane oxidation in the soil surface layer of a flooded rice field and the effect of ammonium. *Biol. Fertil. Soils.* **12**: 28-32.
- Costello, A.M. und M.E. Lidstrom.** 1999. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5066-5074.
- Crutzen, P.J.** 1991. Methane's sinks and sources. *Nature.* **350**: 380-381.

- Czepiel, P.M., P.M. Crill und R.C. Harris.** Environmental factors influencing the variability of methane oxidation in temperate zone soil. *J. Geophys. Res.* **100**: 9359-9364.
- Dalton, H., P.C. Wilkins und Y. Jiang.** 1993. Structure and mechanism of action of the hydroxylase of soluble methane monooxygenase. *In*: Murrell, J.C. und D.P. Kelley (Hrsg.), *Microbial growth on C₁-compounds*. Intercept. Press. Ltd., Andover.
- Dayhoff, M.O.** 1978. Atlas of protein sequence and structure, vol. 5, suppl. 3. Natl. Biomed. Res. Found., Silver Spring, Maryland.
- Dedysh, S.N., N.S. Panikov und J.M. Tiedje.** 1998. Acidophilic methanotrophic communities from Sphagnum peat bogs. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 922-929.
- Dedysh, S.N., N.S. Panikov, W. Liesack, R. Großkopf, J. Zhou und J.M. Tiedje.** 1998b. Isolation of acidophilic methane-oxidizing bacteria from northern peat wetlands. *Science* **282**: 281-284.
- Dedysh, S.N., W. Liesack, V.N. Khmelenina, N.E. Suzina, Y.A. Trotsenko, J.D. Semrau, A.M. Abing, N.S. Panikov und J.M. Tiedje.** 2000. *Methylocella palustris* gen.nov., sp. nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs representing a novel sub-type of serine pathway methanotrophs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 955-969.
- Denier van der Gon, H.A.C. und H.U. Neue.** 1996. Oxidation of methane in the rhizosphere of rice plants. *Biol. Fert. Soils* **22**: 359-366.
- Dobbie, K.E., K.A. Smitz, A. Priemé, S. Christensen, A. Degorska und P. Orlanski.** 1996. Effect of land use on the rate of methane uptake by surface soils in northern Europe. *Atmos. Environ.* **30**: 1005-1011.
- Dunfield, P.F., W. Liesack, T. Henckel, R. Knowles und R. Conrad.** 1999. High-affinity methane oxidation by a soil enrichment culture containing a type II methanotroph. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1009-1014.
- Fabian, P.** 1987. *Atmosphäre und Umwelt*. Springer Verlag, Berlin.
- Felsenstein, J.** 1989. PHYLIP – phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* **5**: 164-166.

Felske, A., B. Engelen, U. Nübel und H. Backhaus. 1996. Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4162-4167.

Felske, A., H. Rheims, A. Wolterink, E. Stackebrandt und A.D.L. Akkermans. 1997. Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class *Actinobacteria* in grassland soils. *Microbiol.* **143**: 2983-2989.

Felske, A., A. Wolterink, R. Van Lis und A.D.L. Akkermans. 1998. Phylogeny of the main bacterial 16S rRNA sequences in Drentse a grassland soils (The Netherlands). *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 871-879.

Fitch, W. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst. Zool.* **20**: 406-416.

Ford, D.L., R.L. Churchwell und R.L. Kachtick. 1980. Comprehensive analysis of nitrification of chemical processing wastewaters. *J. Water Pollut. Control Fed.* **52**: 2726-2745.

Frenzel, P. 2000. Plant-associated methane oxidation in rice fields and wetlands. *In*: Schink, B (Hrsg.), *Advances in Microbial Ecology*. S. 85-114. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Frenzel, P. und U. Bosse. 1996. Methyl fluoride, an inhibitor of methane oxidation and methane production. *FEMS Microbiol. Ecol.* **21**:25-36.

Galchenko, V. F. und L.V. Andreev. 1984. Taxonomy of obligate methylotrophs. *In*: Crawford, R.L. und R.S. Hanson (Hrsg.), *Microbial growth on C₁-compounds*. S. 269-281. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Galchenko, V. F., A. Lein und M. Ivanov. 1989. Biological sinks of methane. *In*: Andreae, M. O. und D. S. Schimel (Hrsg.) *Exchange of Trace Gases Between Terrestrial Ecosystems and the Atmosphere*. S. 59-71. John Wiley and Sons, Chichester.

Gilbert, B. und P. Frenzel. 1995. Methanotrophic bacteria in the rhizosphere of rice microcosms and their effect on porewater methane concentration and methane emission. *Biol. Fert. Soils.* **20**: 93-100.

Gilbert, B. und P. Frenzel. 1998. Rice roots and CH₄ oxidation: the activity of bacteria, their distribution and the microenvironment. *Soil. Biol. Biochem.* **30**: 1903-1916.

Graham, D.W., J.A. Chaudhary, R.S. Hanson und R.G. Arnold. 1993. Factors affecting competition between type-I and type-II methanotrophs in 2-organism, continuous-flow reactors. *Microb. Ecol.* **25**: 1-17.

Graff, A. 2000. Isolierung und molekulare Charakterisierung von schwefeloxidierenden Bakterien aus einem italienischen Reisfeldboden. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg.

Großkopf, R. 1994. Entwicklung eines molekularen Nachweissystems (PCR) für Methan-oxidierende Bakterien basierend auf Gensequenzen der löslichen Methanmonooxygenase. Diploma thesis. Philipps-Universität Marburg, Germany.

Großkopf, R., P.H. Janssen und W. Liesack. 1998. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 960-969.

Grünhage L., K. Hanewald, H.-J. Jäger und W. Ott. 1996. Auswirkungen dynamischer Veränderungen der Luftzusammensetzung und des Klimas auf terrestrische Ökosysteme in Hessen. Jahresbericht (1995) der Umweltbeobachtungs- und Klimafolgenforschungsstation Linden.

Gutell, R.R., N. Larsen und C. R. Woese. 1994. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol. Rev.* **58**:10-26.

Hall, G.H. 1986. Nitrification in lakes. *In*: Prosser, J.I. (Hrsg.), Nitrification. S. 127-156. IRL. Press. Oxford.

Hanson, R.S., Bratina, B.J. und Brusseau, G.A. 1993. Phylogeny and ecology of methylotrophic bacteria. *In*: Murrell, J.C. und D.P. Kelly (Hrsg.), Microbial growth on C₁ compounds. S. 285-302. Intercept Ltd., Andover.

- Hanson, R.S. und T.E. Hanson.** 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* **60**: 439-471.
- Head, I.M., W.D. Hiorns, T.M. Embley, A.J. McCarthy und J.R. Saunders.** 1993. The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1147-1153.
- Henckel, T., M. Friedrich und R. Conrad.** 1999. Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1980-1990.
- Henckel, T., U. Jäckel, S. Schnell und R. Conrad.** 2000a. Molecular analyses of novel methanotrophic communities in forest soil that oxidize atmospheric methane. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1801-1808.
- Henckel, T., U. Jäckel und R. Conrad.** 2000b. Vertical distribution of the methanotrophic community after drainage of rice field soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, in Druck.
- Henckel, T., P. Roslev und R. Conrad.** 2000c. Effects of O₂ and CH₄ on presence and activity of the indigenous methanotrophic community in rice field soil. *Environ. Microbiol.*, in Druck .
- Heyer, J.** 1977. Results of enrichment experiments of methane-assimilating organisms from an exological point of view. *In*: Skryabin, G.A., M.B. Ivanov, E.N. Kondratjeva, G.A. Zaarzin, Y.A. Trostsenko und A.I. Netrosev (Hrsg.) *Microbial growth on C₁ compounds*. Academy of Sciences, U.S.S.R.
- Heuer, H. und K. Smalla.** 1997. Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Temperature Gradient Gel Electrophoreses for Studying Soil Microbial Communities, *In*: Elsas, J.D., J.T. Trevors und E.M.H. Wellington (Hrsg.), *Modern soil microbiology*. S. 353-373. Marcel Dekker, New York.
- Hiorns, W.D., R.C. Hastings, I.M. Head, A.J. McCarthy, J.R. Saunders, R.W. Pickup und G.H. Hall.** 1995. Amplification of 16S ribosomal RNA genes of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria demonstrates the ubiquity of nitrosospiras in the environment. *Microbiol.* **141**: 2793-2800.
- Hogan, K.B., J.S. Hoffman und A.M. Thompson.** 1991. Methane on the greenhouse agenda. *Nature.* **354**: 181-182.

Holben, W.E., J.K. Jansson, B.K. Chelm und J.M. Tiedje. 1988. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 703-711.

Holmes, A.J., N.J.P. Owens und J.C Murrell. 1995. Detection of novel marine methanotrophs using phylogenetic and functional gene probes after methane enrichments. *Microbiology.* **141**: 1947-1955.

Holmes, A.J., A. Costello, M.E. Lidstrom und J.C Murrell. 1995. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**: 203-208.

Holmes, A.J., P. Roslev, I. R. McDonald, N. Iversen, K. Henriksen und J.C Murrell. 1999. Characterization of methanotrophic bacterial populations in soils showing atmospheric methane uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3312-3318.

Horz, H.-P., J.-H-Rotthauwe, T. Lukow und W. Liesack. 2000. Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of amoA PCR products. *J. Microbiol. Methods.* **39**: 197-204.

Hugenholtz, P., B.M. Goebel und N.R. Pace. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* **180**: 4765-4774.

Hütsch, B.W., C.P. Webster und D.S. Powlson. 1994. Methane oxidation in soil as affected by land use, soil pH and N fertilization. *Soil Biol. Biochem.* **26**: 1613-1622.

Hyman, M.R. und P.M. Wood. 1984. Ethylene oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* **137**: 155-158.

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). 1992. Climate Change, the supplementary report to the IPCC scientific assessment, Cambridge University Press, New York, USA.

- Jarvis, S.C., D.R. Lockyer, G. Warren, D.J. Hatch und G. Dollard.** 1994. Preliminary studies of the exchanges of methane between grassland and the atmosphere. *In*: Mannetje, L.T. und J. Frame (Hrsg.), Grassland and Society. S. 408-412. Wageningen Press, Wageningen.
- Jensen, S., A.J. Holmes, R.A. Olsen und J.C. Murrell.** Detection of methane oxidizing bacteria in forest soils by monooxygenase PCR amplification. *Microbial Ecol.* **39**: 282-289
- Jones, R.D., R.Y. Morita, H.-P. Koops und S.W. Watson.** 1988. A new marine ammonium-oxidizing bacterium, *Nitrosomonas cryotolerans* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* **34**: 1122-1128.
- Jukes, T.H. und C.R. Cantor.** 1969. Evolution of protein molecules. *In* Munro, H.N. (Hrsg.), Mammalian protein metabolism, S. 21-132. Academic Press, Inc., New York.
- Juretschko, S., G. Timmermann, M. Schmid, K.-H. Schleifer, A. Pommerening-Röser, H.-P. Koops und M. Wagner.** 1998 Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3042-3051.
- Khalil, M. A. K. und R. A. Rasmussen.** 1994. Global emissions of methane during the last several centuries. *Chemosphere* **29**: 833-842.
- Kimura, M.** 1983. The neutral theory of molecular evolution. *In*: Nei, M. und R.K. Koehn (Hrsg.), Evolution of genes and proteins, S. 208-233. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- King, G.M. und S. Schnell.** 1994. Effect on increasing atmospheric methane concentration on ammonium inhibition of soil methane consumption. *Nature.* **370**: 282-284.
- Koops, H.-P., B. Böttcher, U.C. Möller, A. Pommerening-Röser und G. Stehr.** 1990. Description of a new species of *Nitrosococcus*. *Arch. Microbiol.* **154**: 244-248.
- Kowalchuk, G.A., J.R. Stephen, W. De Boer, J.I. Prosser, T.M. Embley und Woldendorp, J.W.** 1997. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class *Proteobacteria* in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1489-1479.

Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p.115-175. In E. Stackebrandt und M. Goodfellow (Hrsg.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.

Lee, D.-H. Y.-G. Zo und S.J. Kim. 1996. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. Appl. Environ. Microbiol. **62**: 3112-3120.

Liesack, W. und E. Stackebrandt. 1992. Occurrence of a novel group of the domain bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. J. Bacteriol. **174**: 5072-5078.

Liu, W.-T., T.L Marsh, H. Cheng und L.J. Forney. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. **63**: 4516-4522.

Lüdemann, H, I. Arth und W. Liesack. 2000. Spatial changes in the bacterial community structure along a vertical oxygen gradient in flooded paddy soil cores. Appl. Environ. Microbiol. **66**: 754-762.

Ludwig, W. 1995. Sequence Databases. In Akkermans, A. D. L., J. D. van Elsas und F. J. de Bruijn (Hrsg.), Molecular Microbial Ecology Manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.

Ludwig, W. und K.-H. Schleifer. 1994 Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. FEMS Microbiol. Rev. **15**: 155-173.

Ludwig, W., O. Strunk, S. Klugbauer, N. Klugbauer, M. Weizenegger, J. Neumaier, M. Bachleitner, K.H. Schleifer. 1998. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. Electrophoresis. **19**: 554-568.

Lukow, T., P.F. Dunfield und W. Liesack. 2000. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. FEMS Microbiol. Ecol. **32**: 241-247.

MacDonald, R.M. 1986. Nitrification in soil: an introductory history. In: Prosser, J.I. (Hrsg.), Nitrification. S. 1-16. IRL. Press. Oxford.

- McDonald, I.R., E.M. Kenna und J.C. Murrell.** 1995. Detection of methanotrophic bacteria in environmental samples with PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:116-121.
- McDonald, I.R., G.H. Hall, R.W. Pickup und J.C. Murrell.** 1996. Methane oxidation potentials and preliminary analysis of methanotrophs in blanket peat bog using molecular ecology techniques. *FEMS Microbiol. Ecol.* **21**: 197-211.
- McDonald, I.R. und J.C Murrell.** 1997. The particulate methane monooxygenase gene *pmoA* and its use as a functional gene probe for methanotrophs. *FEMS Microbiol. Lett.* **156**: 205-210.
- McDonald, I.R. und J.C Murrell.** 1997. The methanol dehydrogenase structural gene *mxhF* and its use as a functional gene probe for methanotrophs and methylotrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3218-3224.
- Maidak, B. L., G. J. Olsen, N. Larsen, R. Overbeek, M. J. McCaughey und C. R. Woese.** 1996. The ribosomal database project. *Nucl. Acid. Res.* **24**: 82-85.
- Matulewich, V.A., P.F Strom und M.S. Finstein.** 1975. Length of incubation for enumerating nitrifying bacteria present in various environments. *Appl. Microbiol.* **29**: 256-268.
- Meincke, M., E. Krieg und E. Bock.** 1989. *Nitrosovibrio* spp., the dominant ammonia-oxidizing bacteria in building sandstone. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2108-2110.
- Miguez, C.B., D. Bourque, J.A. Sealy, C.W. Greer und D. Groleau.** 1997. Detection and isolation of methanotrophic bacteria possessing soluble methane monooxygenase (sMMO) genes using the polymerase chain reaction (PCR). *Microb. Ecol.* **33**: 21-31.
- Mosier, A., D. Schimmel, D. Valentine, K. Bronson und W. Parton.** 1991. Methane and nitrous oxide fluxes in native, fertilized and cultivated grasslands. *Nature.* **350**: 330-332.
- Moeseneder, M.M., J.M: Arrieta, G. Muyzer, C. Winter und G.J. Herndl.** 1999. Optimization of Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis for complex marine Bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3518-3525.

- Muyzer, G., E.C. DeWaal und A.G. Uitterlinden.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 695-700.
- Neufeld, J.D. und R. Knowles.** 1999. Inhibition of nitrifiers and methanotrophs from an agricultural humisol by allylsulfide and its implications for environmental studies. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2461-2465.
- Nguyen, H.H.T., S.J. Elliott, J.H.K. Yip und S.I. Chan.** 1998. The particulate methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) is a novel copper-containing three-subunit enzyme - isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* **273**: 7957-7966.
- Oldenhuis, R., R.L.J.M Vink, D.B. Janssen und B. Witholt.** 1989. Degradation of chlorinated aliphatic hydrocarbons by *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing soluble methane monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2819-2826.
- Osborne, A.M., E.R.B. Moore und K.N. Timmis.** 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* **2**: 39-50.
- Painter, H.A.** 1986. Nitrification in the treatment of sewage and wastewaters. *In*: Prosser, J.I. (Hrsg.), Nitrification. S. 185-211. IRL Press. Oxford.
- Pommerening-Röser, A., G. Rath und H.-P. Koops.** 1996. Phylogenetic diversity within the genus *Nitrosomonas*. *Syst. Appl. Microbiol.* **19**: 344-351.
- Purkhold, U., A. Pommerening-Röser, S. Juretschko, M.C. Schmid, H.-P. Koops und Michael Wagner.** 2000. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5368-5382.
- Prinn, R. G.** 1994. Global atmospheric-biospheric chemistry. *In*: Prinn, R.G. (Hrsg.), Global atmospheric-biospheric chemistry, S. 1-18. Plenum, New York.
- Rheims, H., F.A. Rainey und E. Stackebrandt.** 1996. A molecular approach to search for diversity among bacteria in the environment. *J. Ind. Microbiol.* **17**: 159-169.

Rodhe, H. 1990. A comparison of the contribution of various gases to the greenhouse effect. *Science* **248**: 1217-1219.

Roslev, P. und G.M. King. 1994. Survival and recovery of methanotrophic bacteria starved under oxic and anoxic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1563-1570.

Roslev, P. und G.M. King. 1995. Aerobic and anaerobic starvation metabolism in methanotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1563-1570.

Rosset, R., J. Julien und R. Monier. 1966. Ribonucleic acid composition of bacteria as a function of growth rate. *J. Mol. Biol.* **18**: 308-320.

Rotthauwe, J.-H. 1997. Molekulare Untersuchungen von nativen Populationen nitrifizierender Bakterien anhand des funktionellen Markergens *amoA*. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.

Rotthauwe, J.-H., K.-P. Witzel und W. Liesack. 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4704-4712.

Roy, R. und R. Knowles. 1995. Differential inhibition by allylsulfide of nitrification and methane oxidation in freshwater sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 4278-4283

Sanger, F. S. Nicklen und A.R. Coulson. 1977. DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 5463-5467.

Saitou, N. und M. Nei. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.

Sarkano, Y. und L. Kerkhof. 1998 Assessment of changes in microbial community structure during operation of an ammonia biofilter with molecular tools. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4877-4882.

Sambrock, J., E.F. Fritsch und T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2. Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sass, R.L. 1994. Short summary chapter for methane. *In*: Minami. T. und K.A. Mosier (Hrsg.), CH₄ and N₂O: Global emission and controls from rice fields and other agricultural and industrial sources, S. 1-8. Yokendo, Tokyo.

Schütz, H., W. Seiler und R. Conrad. 1989. Processes involved in formation and emission of methane in rice paddies. *Biogeochemistry* **7**: 33-53.

Segers, R. 1998. Methane production and methane consumption: a review of processes underlying wetland methane fluxes. *Biogeochemistry*. **41**: 23-51.

Shigematsu, T., S. Hanada, M. Eguchi, Y. Kamagata, T. Kanagawa und R. Kurane. 1999. Soluble methane monooxygenase gene clusters from trichloroethylene-degrading *Methylomonas* sp. strains and detection of methanotrophs during in situ bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5198-5206.

Söhngen, N.L. 1906. Über Bakterien, welche Methan als Kohlenstoffnahrung und Energiequelle gebrauchen. *Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkd.* **15**: 513-517.

Speksnijder, A.G.C.L., G.A. Kowalchuk, S. de Jong, H.J. Laanbroek. 1999. *In*. Speksnijder, A.G.C.L. (Hrsg.), Community analysis of β -subgroup ammonia oxidizing bacteria in aquatic environments: a molecular approach.

Stephen, J.R., A.E. McCaig, Z. Smith, J.I. Prosser und T.M. Embley, 1996. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to β -subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4147-4154.

Stephen, J.R., Y.J. Chang, S.J. Macnaughton, G.A. Kowalchuk, K.T. Leung, C.A. Flemming und D.C. White. 1999. Effect of toxic metals on indigenous soil β -subgroup proteobacterium ammonia oxidizer community structure and protection against toxicity by inoculated metal-resistant bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 95-101.

Strunk, O. und W. Ludwig. 1996. ARB: a software environment for sequence data. <http://www.biol.chemie.tu-muenchen.de/pub/ARB/>. Technische Universität München.

- Teske, A., C. Wawer, G. Muyzer und N.B. Ramsing.** 1996. Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1405-1415.
- Tortoso, A.C. und G.L. Hutchinson.** 1990. Contributions of autotrophic and heterotrophic nitrifiers to soil NO and N₂O emission. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1799-1805.
- Tsien, H.C., B.J. Bratine, K. Tsuji und R.S. Hanson.** 1990. Use of oligodeoxynucleotide signature probes for identification of physiological groups of methylotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2858-2865.
- Van de Peer, Y., S. Chapelle und R. De Wachter.** 1996. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucl. Acids Res.* **24**: 3381-3391.
- Van den Pol-van Dasselaar, A., W.J. Corré, A. Priemé, A.K. Klemedtsson, P. Weslien, A. Stein, L. Klemedtsson und O. Oenema.** 1998. Spatial variability of methane, nitrous oxide, and carbon dioxide emissions from drained grasslands. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **62**: 810-817.
- Vannelli, T., D. Bergmann, D.M. Arciero und A.B. Hooper.** 1996. Mechanism of N-oxidation and electron transfer in the ammonia oxidizing autotrophs,. *In*: Lidstrom. M.E. und F.R. Tabita (Hrsg.), *Microbial growth on C₁ compounds*. S. 80-87. Kluwer, Dordrecht, Niederlande.
- Vecherskaya, M.S., V.F. Galchenko, E.N. Sokolova und V.A. Samarkin.** 1993. Activity and species composition of aerobic methanotrophic communities in tundra soils. *Curr. Microbiol.* **27**: 181-184.
- Wagner, R.** 1994. The regulation of ribosomal RNA synthesis and bacterial cell growth. *Arch. Microbiol.* **161**: 100-106.
- Wahlen, M., N. Tanaka, R. Henry, B. Deck, J. Zeglen, J. S. Vogel, J. Southon, A. Shemesh, R. Fairbanks und W. Broecker.** 1989. Carbon-14 in methane sources and in atmospheric methane: the contribution from fossil carbon. *Science* **245**: 286-290.

Ward, B.B., M.A. Voytek und K.-P. Witzel. 1997. Phylogenetic diversity of natural populations of ammonia-oxidizers investigated by specific PCR amplification. *Microb. Ecol.* **33**: 87-96.

Watson, S.W., F.W. Valois und J.B. Waterbury. 1981. The family *Nitrobacteriaceae*. In: Starr, M.P., H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows und H.G. Schlegel (Hrsg.) *The prokaryotes*. S. 1005-1020. Springer-Verlag, New York.

Weisburg, W. G., S.M Barns, D.A. Pelletier und D.L. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **2**: 697-703.

Willison T.W., C.P. Webster, K.W.T. Goulding und D.S. Powlson. 1995. Methane oxidation in temperate soils: effects of land use and the chemical form of nitrogen fertilizer. *Chemosphere.* **30**: 539-546.

Winogradsky, S. 1891. 5th Memoire. Recherches sur les organismes de la nitrification. *Ann. Inst. Pasteur.* **5**: 577-616.

Wise, M. G., J.V. McArthur und L.J. Shimkets. 1999. Methanotroph diversity in landfill soil: isolation of novel type I and type II methanotrophs whose presence was suggested by culture-independent 16S ribosomal DNA Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4887-4897.

Whittenbury, R., S.L. Davies und J.F. Davey. 1970. Exospores and cysts formed by methane-utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **61**: 219-226.

Zahn, J.A. und A.A. Dispirito. 1996. Membrane-associated methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus*. *J. Bacteriol.* **4**: 1018-1029.

Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of *amoA* PCR products

Hans-Peter Horz, Jan-Henrich Rothauwe, Thomas Lukow, Werner Liesack*

Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Karl-von-Frisch-Str., D-35043 Marburg, Germany

Accepted 16 September 1999

Abstract

A cloning-independent method based on T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) analysis of *amoA* PCR products was developed to identify major subgroups of autotrophic ammonia oxidizers of the beta-subclass of the class *Proteobacteria* in total community DNA. Based on a database of 28 partial gene sequences encoding the active-site polypeptide of ammonia monooxygenase (*amoA*), defined lengths of terminal restriction fragments (= operational taxonomic units, OTUs) of *amoA* were predicted to correlate in *TaqI*-based T-RFLP analysis with phylogenetically defined subgroups of ammonia oxidizers. Members of the genus *Nitrosospira* showed a specific OTU of 283 bp in length, while a fragment size of 219 bp was indicative of *Nitrosomonas*-like sequence types including *N. europaea*, *N. eutropha*, and *N. halophila*. Two *amoA* sequence clusters designated previously as the lineages ‘Plußsee’ and ‘Schöhsee’ [Rothauwe, J.-H., Witzel, K.-P., Liesack, W., 1997. Appl. Environ. Microbiol. 63, 4704–4712] shared a *TaqI*-based OTU with a fragment size of 48 bp, but sequence types of these two lineages could be differentiated by *AluI*-based T-RFLP analysis. A survey of various environmental samples and enrichment cultures by T-RFLP analysis and by comparative analysis of cloned *amoA* sequences confirmed the predicted correlations between distinct OTUs and phylogenetic information. Our data suggest that *amoA*-based T-RFLP analysis is a reliable tool to rapidly assess the complexity of ammonia-oxidizing communities in environmental samples with respect to the presence of major subgroups, i.e. nitrospiras versus nitrosomonads. © 2000 Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Ammonia oxidizers; *amoA*; Comparative sequence analysis; Molecular fingerprinting; T-RFLP analysis

1. Introduction

Because of the biogeochemical importance of ammonia-oxidizing bacteria, methods are needed for their detection, identification, and enumeration. However, ammonia oxidizers are extremely slow-growing. This makes traditional cultivation methods

based on most-probable-number techniques (Matulewich et al., 1975) or selective plating (Ford et al., 1980) very time-consuming. Moreover, such approaches often result in poor counting efficiencies and lead to a collection of ammonia oxidizers that is not representative of the actual diversity and abundance in a given environment (Hiorns et al., 1995). Consequently, 16S rDNA-based PCR assays have been developed to specifically detect autotrophic ammonia oxidizers of the beta-subclass of the class *Proteobacteria* in environmental samples (Voytek

*Corresponding author. Tel.: +49-6421-178-720; fax: +49-6421-178-809.

E-mail address: liesack@mail.uni-marburg.de (W. Liesack)

and Ward, 1995; Stephen et al., 1996). Their use has provided novel insights into the phylogenetic diversity of indigenous communities of autotrophic ammonia oxidizers. Most notably, these assays have resulted in the detection of several novel sublineages within the *Nitrosomonas/Nitrosospira* clade, of which no cultured representatives are yet available (Kowalchuk et al., 1997).

In addition to the 16S rDNA approach, a functional gene-based PCR assay has been developed to assess the diversity of naturally occurring ammonia-oxidizing communities (Rotthauwe et al., 1997). This assay targets a 491-bp stretch of the *amoA* gene which encodes the active-site polypeptide of the ammonia monooxygenase enzyme (McTavish et al., 1993). Its application to DNA recovered from various environmental sites and from cultured strains has resulted in the generation of a database of more than 25 partial *amoA* gene sequences (Rotthauwe et al., 1997). The trees constructed based on *amoA* sequences were in good agreement with the corresponding 16S rDNA-based trees, i.e. the treeing analysis grouped the *amoA* sequence types in phylogenetically defined clusters such as *Nitrosospira* spp. and *Nitrosomonas* spp. (Rotthauwe et al., 1997; Stephen et al., 1999).

However, the identification of major subgroups of the *Nitrosomonas/Nitrosospira* clade in both environmental 16S rDNA and *amoA* PCR products requires either the creation of clone libraries followed by comparative analysis of individual clone sequences (Rotthauwe et al., 1997; Sakano and Kerkhof, 1998; Stephen et al., 1999) or hybridization studies with defined group-specific oligonucleotide probes (Kowalchuk et al., 1999). Both approaches are rather laborious and therefore might not be suitable for studies which require the comparative analysis of a large number of environmental samples. Therefore we developed a cloning-independent procedure which permits a rapid assessment of the complexity of ammonia-oxidizing communities in environmental samples with respect to the major subgroups. This procedure is based on the terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis (Bruce, 1997; Liu et al., 1997) of *amoA* PCR products. In analogy to environmental 16S rDNA-based studies (Moyer et al., 1994, 1995), defined terminal restriction fragments will be referred to as 'operational taxonomic units' (OTUs).

2. Materials and methods

2.1. Organisms and environmental samples

Partial *amoA* gene sequences were determined for *Nitrosomonas halophila* Nm1, *Nitrosomonas nitrosa* Nm90, and *Nitrosospira* sp. L13. Environmental samples and enrichment cultures investigated in the course of this study or in a previous study were as follows (the prefixes used in the text to indicate the respective samples are given in parentheses): (1) roots of rice plants grown in flooded microcosms (Frenzel et al., 1992) for 60 days (RR60H) or 90 days (RR90); (2) activated sludge of two different sewage plants (SP, ASK); (3) water from Lake Plußsee, Schleswig-Holstein, Germany ('Plußsee') and a pond located near to Marburg, Hessen, Germany (TUK); (4) enrichment cultures inoculated with a water sample from Lake Schöhsee, Schleswig-Holstein, Germany ('Schöhsee'), or from the Baltic Sea (OST).

2.2. Molecular recovery of *amoA*

The general procedure, i.e. the extraction of DNA, PCR-mediated amplification of partial *amoA* genes, cloning of PCR products, and sequencing of cloned *amoA*, has been described previously (Rotthauwe et al., 1997). The forward primer used (*amoA*-1F; 5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT) targets a stretch corresponding to positions 332 to 349 and the reverse primer used (*amoA*-2R; 5'-CCCCTCK-GSAAAGCCTTCTTC [K=G or T; S=G or C]) targets a stretch corresponding to positions 802 to 822 of the open reading frame published for the *amoA* gene sequence of *Nitrosomonas europaea* (McTavish et al., 1993). For T-RFLP analysis PCR amplification of *amoA* was carried out with the forward primer (*amoA*-1F) 5'-labeled with the dye 5-carboxyfluorescein. Amplification was performed in a total volume of 100 µl in 0.2-ml Eppendorf tubes, using a DNA thermocycler (model 2400; Perkin-Elmer Cetus, Foster City, CA). Reactions were carried out in a solution containing 1× PCR buffer (20 mM Tris-HCl, 25 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5% Tween 20, and 100 µg of bovine serum albumin per ml), 20 nmol of each deoxynucleoside triphosphate, 30 pmol of each primer, 1 µl of template DNA, and 2.5 U of *Taq* DNA

polymerase (Perkin-Elmer). The enzyme was added after the first denaturation step. The thermal profile used for the amplification of the *amoA* target sequences was as follows: 5 min at 94°C; pause at 80°C to add polymerase; then 30 cycles (pure cultures) or 35 cycles (environmental samples) consisting of 90 s at 60°C (annealing), 90 s at 72°C (elongation), and 60 s at 94°C (denaturation); and a final cycle consisting of 90 s at 60°C and 10 min at 72°C. Aliquots (10 µl) of the PCR products were electrophoresed and visualized in 1% agarose gels by using standard electrophoresis procedures.

2.3. Comparative analysis of *amoA* sequence data

The currently available database of more than 50 partial *amoA* gene sequences was integrated with the ARB program package (Strunk and Ludwig, 1988). ARB [=arbor (Latin), tree] is a software environment to process and analyze sequence data and can be obtained via WWW from <http://www.biol.chemie.tu-muenchen.de/pub/ARB/>. The *amoA* sequence database can be obtained on request either by e-mail or on disk from the corresponding author. Nearly all sequences cover a continuous stretch of 450 nucleotides corresponding to positions 352 through 801 of the *amoA* gene sequence of *Nitrosomonas europaea* (McTavish et al., 1993). Tree construction was carried out using the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) and the appropriate tools of the ARB program package.

2.4. T-RFLP analysis

In principle, the T-RFLP analysis was carried out as previously described for PCR-amplified 16S rRNA genes (Liu et al., 1997) and mercury resistance genes (Bruce, 1997). The tetrameric restriction enzymes *TaqI* (recognition site: T/CGA), *CfoI* (recognition site: GCG/C) and *AluI* (recognition site: AG/CT) were used in this study (Promega, Mannheim, Germany). The fluorescently labeled PCR products (≈2 µg DNA) were purified using the Prep-A-Gene system according to the instructions of the manufacturer (Bio-Rad, Munich, Germany) and finally eluted with Tris-HCl (pH 8.0; final volume of 30 µl). Aliquots (1–8 µl) of the purified PCR products were digested with *TaqI*, *CfoI*, or *AluI* for 3 h using conditions recommended by the manufac-

turer (Promega). For *CfoI* and *AluI* an incubation temperature of 37°C was used, and for *TaqI* 65°C. Aliquots (2.5 µl) of each digest were mixed with 2.0 µl of formamide and 0.5 µl of an internal length standard (GeneScan-1000 ROX, PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany). The internal length standard consisted of 17 different 6-carboxy-X-rhodamine labeled fragments ranging in length from 29 to 928 nucleotides. The samples were denatured at 94°C for 5 min and immediately placed on ice until loading onto a 24-cm long denaturing polyacrylamide gel (6%). Electrophoresis was carried out in the GeneScan mode of an automated DNA sequencer (model 373, PE Applied Biosystems) for up to 6 h using the following settings: 2500 V, 40 mA, and 27 W. After electrophoresis, the size of each OTU was determined in comparison to the fluorescently labeled size fragments of the internal length standard using the GeneScan analysis software provided by the manufacturer (PE Applied Biosystems). The relative abundances of individual OTUs in a given *amoA* PCR product were calculated based on the peak areas of the individual OTUs in relation to the total peak area of all OTUs detected in the respective T-RFLP community fingerprint pattern. Peak areas were automatically quantified by the GeneScan analysis software.

2.5. Nucleotide sequence accession numbers

The partial *amoA* gene sequences determined for *Nitrosomonas halophila* Nm1, *Nitrosomonas nitrosa* Nm90, and *Nitrospira* sp. L13, as well as those recovered from various environmental sites (RR60H, TUK, and ASK) and enrichment cultures (Ost) have been deposited in the EMBL, GenBank, and DDBJ nucleotide sequence databases under the accession numbers AJ238541, AJ238495, AJ238542, and AJ238543 through AJ238553.

3. Results and discussion

3.1. General considerations of the *amoA*-based T-RFLP concept

A prerequisite for the successful development of the cloning-independent *amoA*-based T-RFLP technique (Fig. 1) was the high target specificity of the

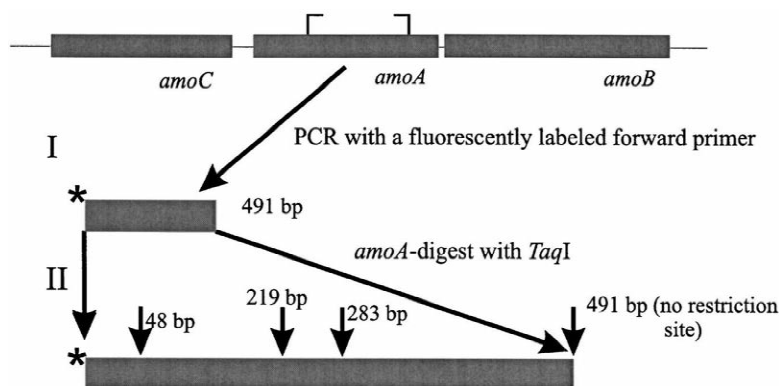


Fig. 1. General scheme of the *amoA*-based T-RFLP analysis. The upper panel indicates the structural organization of the polygenic operon encoding ammonia monooxygenase (AMO), an enzyme composed of three subunits (Klotz et al., 1997). The asterisk indicates the presence of the fluorescence dye 5-carboxyfluorescein. The arrows at the positions 48 bp, 219 bp, and 283 bp indicate possible recognition sites for the tetrameric restriction endonuclease *TaqI* within the set of partial *amoA* gene sequence types currently available in our database.

amoA PCR assay. A false-positive recovery of non-*amoA* sequence types from environmental samples has not yet been observed. This is in contrast to 16S rDNA-based PCR assays developed for the specific detection of ammonia oxidizers of the *Nitrosomonas*/*Nitrospira* clade, for which the co-amplification of 16S rRNA genes from nonnitrifying bacteria has been reported (Stephen et al., 1996). We used the endonuclease *TaqI* for the restriction of the *amoA* PCR products. The use of this enzyme resulted in the

reproducible detection of four different OTUs (Fig. 1, Table 1) in accordance with the *TaqI* restriction sites predicted for defined *amoA* sequence types in our database (Fig. 2). In order to enlarge the available database of *amoA* sequences, we determined partial *amoA* gene sequences for *Nitrosomonas halophila* Nm1, *Nitrosomonas nitrosa* Nm90, and *Nitrospira* sp. L13, and also recovered *amoA* by PCR and cloning directly from various environmental samples and enrichment cultures.

Table 1
OTUs detected in various environmental sites by *TaqI*-based T-RFLP analysis^a

Samples	Habitat	Name	OTUs (fragment length)				
			48 bp			219 bp	283 bp
			P	S1	NmN	Nm	Nsp
Nonenriched samples	Terrestrial	RR60H					100
		RR90	22				78
	Freshwater	Plußsee	100				
		TUK				59	41
		SP		8		71	21
Enriched samples	Activated sludge	ASK		6			94
	Freshwater	Schöhsee		100			
	Baltic Sea	OST					100

^a The numbers indicate the relative abundance of individual OTUs. The abundance values were calculated based on the peak areas of the individual OTUs in relation to the total peak area of all OTUs detected in the respective community fingerprint pattern. The peak areas were automatically quantified by the GeneScan analysis software (PE Applied Biosystems). The alphanumeric symbols refer to defined subgroups of ammonia oxidizers to which the OTUs were assigned via comparative sequence analysis of cloned *amoA* (Fig. 2): P, 'Plußsee'; S1, 'Schöhsee'; NmN, *Nitrosomonas nitrosa*; Nm, *Nitrosomonas* cluster; Nsp, *Nitrospira* cluster; S2, subcluster of 'Schöhsee'. The assignment of the 48-bp OTU to distinct subgroups was achieved by additional T-RFLP analysis using the restriction endonucleases *CfoI* or *AluI*. The use of *CfoI* permitted the identification of *Nitrosomonas nitrosa*-like sequences, while *AluI* resulted in the differentiation between members of the lineages 'Plußsee' and 'Schöhsee'.

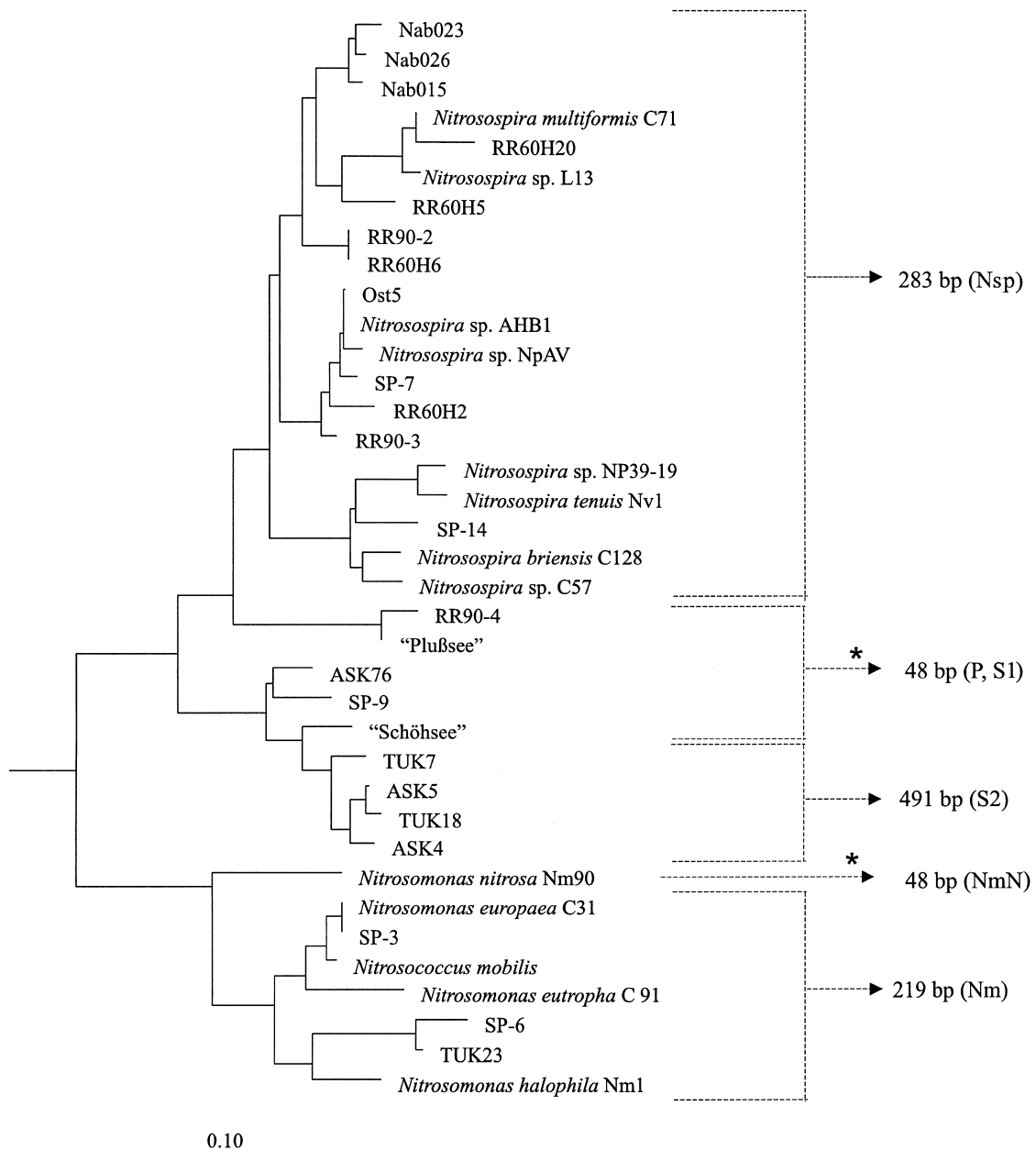


Fig. 2. Phylogenetic dendrogram constructed for partial *amoA* gene sequences based on a neighbor-joining analysis (Saitou and Nei, 1987) of 150 deduced amino acid sites. The dendrogram shows the positions of cultured ammonia oxidizers in relation to environmental sequences recovered from 60-day and 90-day-old roots of submerged rice plants (RR60H, RR90), activated sludge of two different sewage treatment plants (SP, ASK), Lake Plußsee ('Plußsee'), a pond (TUK), metal-contaminated soil (Nab; Stephen et al., 1999), and enrichment cultures inoculated with samples from Lake Schöhsee ('Schöhsee'), or from the Baltic Sea (OST). Apart from the clones prefixed Nab (Stephen et al., 1999), *amoA* sequence data used to construct the dendrogram were either taken from Rotthauwe et al. (1997) or generated in the course of this study. The root was determined using the homologous *pmoA* stretch of *Methylococcus capsulatus* Bath. The numbers indicate the size of group-specific OTUs which occur in *TaqI*-based T-RFLP analysis (see also Table 1). The asterisks indicate those two identical OTUs which had to be further analyzed by using *CfoI* and *AluI*. The scale bar represents 10% divergence in nucleotide sequence positions.

Randomly selected *amoA* clone sequences were examined by T-RFLP analysis. For each individual *amoA* clone sequence, the T-RFLP analysis resulted in one defined terminal restriction fragment which exactly matched one of the four distinct OTUs detected in the community fingerprint patterns. The latter result provides experimental evidence for the strict correlation between naturally occurring *amoA* sequence types and the *TaqI*-based OTUs detected in the community fingerprint patterns.

3.2. Assignment of distinct *TaqI*-based OTUs to defined subgroups of ammonia oxidizers

All *amoA* sequence types which grouped within the phylogenetic radiation characterized by cultured members of the genus *Nitrosospira* showed an OTU of 283 bp. The characterization of the 283-bp OTU as highly specific for *Nitrosospira* spp. is also supported by *Nitrosospira*-like *amoA* clone sequences recovered by Stephen et al. (Stephen et al., 1999) from metal-contaminated soil samples (clones Nab015, Nab023, and Nab026, Fig. 2), for which the 283-bp OTU was predicted based on the available nucleotide sequence information. In contrast, a 219-bp OTU was highly indicative of members of the *Nitrosomonas* branch characterized by *N. europaea*, *N. eutropha*, *N. halophila*, and *Nitrosococcus mobilis* (Juretschko et al., 1998). A 48-bp OTU was indicative of *amoA* sequences of two distinct subgroups designated in a previous study as the lineages 'Plußsee' and 'Schöhsee' (Rotthauwe et al., 1997), as well as of *Nitrosomonas nitrosa* (Fig. 2). A differentiation of these subgroups was possible with T-RFLP analysis using *CfoI* and *AluI* (see Section 3.3.). Finally, a 491-bp OTU was characteristic of a subcluster of the 'Schöhsee' lineage which possessed no *TaqI*-restriction site at all (Fig. 2).

3.3. Differentiation between the lineages 'Plußsee', 'Schöhsee', and *Nitrosomonas nitrosa*

In order to achieve a further differentiation between the *amoA* gene sequences of the lineages 'Plußsee', 'Schöhsee', and *Nitrosomonas nitrosa* which share the 48-bp OTU in *TaqI*-based T-RFLP analysis, we carried out a database search to identify appropriate tetrameric restriction endonucleases.

Based on this database search, *AluI* and *CfoI* were predicted to enable a specific differentiation between *amoA* sequence types of the 'Plußsee'/'Schöhsee' lineages and *Nitrosomonas nitrosa*-like sequences. A 103-bp OTU was highly indicative of the 'Plußsee' lineage in *AluI*-based T-RFLP analysis, while a 225-bp OTU was unique to members of the 'Schöhsee' lineage. *Nitrosomonas nitrosa*-like sequences were identified by a specific 119-bp OTU in *CfoI*-based T-RFLP analysis (Table 1).

3.4. Relative PCR retrieval efficiency of *amoA*

The *amoA*-based T-RFLP analysis allows the cloning-independent identification of OTUs which correspond to defined subgroups of ammonia oxidizers. In addition, it permits the determination of the relative abundances of the individual OTUs detected in community fingerprint patterns. However, the PCR-based retrieval of sequence data may be strongly distorted by method-inherent biases (Chandler et al., 1997; Liesack et al., 1997; Von Wintzingerode et al., 1997). We therefore mixed genomic DNA of *N. europaea* C31 and *N. tenuis* Nv1 in defined ratios and then performed *amoA*-based PCR as described in Section 2.2. This was done in order to determine whether or not *amoA* gene sequences from representatives of the genera *Nitrosomonas* and *Nitrosospira* can be expected to be amplified with roughly similar efficiency in environmental PCR-based retrieval studies. T-RFLP analysis of the resulting PCR products showed that the relative abundances of the 219-bp and 283-bp OTUs indicative of *Nitrosomonas*-like and *Nitrosospira*-like sequences, respectively, largely but not exactly reflected the initial DNA input ratios of 1:1, 1:5, and 1:20 (Table 2). Input ratios of 1:100 between the two genomic DNAs resulted in failure to detect the minor component. Although the results of this simple model system may not be representative of all *amoA*-based environmental studies with unknown compositions of *amoA* sequence types, these results suggest that the simultaneous retrieval of *Nitrosomonas*-like and *Nitrosospira*-like *amoA* sequence types is not strongly biased by PCR. Obviously, the relative abundance of different sequence types in environmental PCR products or in a subsequently generated clone library cannot be taken as a measure of the exact in situ

Table 2

Relative abundances (% \pm standard deviation) of the 219-bp and 283-bp OTUs, indicative in *TaqI*-based T-RFLP analysis of *Nitrosomonas*-like and *Nitrospira*-like sequence types, respectively, from an *amoA*-based PCR using defined ratios of genomic DNA from *Nitrosomonas europaea* and *Nitrospira tenuis* as the starting material. Data are based on three replicate samples, each with an independent PCR and T-RFLP analysis

Tested organisms	Input ratio of genomic DNAs and relative abundances of the respective OTUs						
<i>Nitrosomonas europaea</i>	1	1	1	1	1:5	1:20	1:100
<i>Nitrospira tenuis</i>	1:100	1:20	1:5	1	1	1	1
219-bp OTU (<i>N. europaea</i>)	100	93 \pm 1.0	69 \pm 1.2	56 \pm 4.6	31 \pm 7.5	6 \pm 1.0	0
283-bp OTU (<i>N. tenuis</i>)	0	7 \pm 1.0	31 \pm 1.2	44 \pm 4.6	69 \pm 7.5	94 \pm 1.0	100

composition of the targeted microbial groups. However, the results of the model system clearly indicate that differences between *amoA*-based T-RFLP patterns correlate with differences in the input ratios of *amoA* gene sequence types in the PCR and thus with differences in the structural composition of the respective ammonia-oxidizing communities. This interpretation of our data agrees well with PCR-based environmental studies which demonstrated shifts in the structural composition of ammonia-oxidizing communities based on differences in the relative abundance of partial *amoA* gene sequences in clone libraries generated before and after experimental treatments (Sakano and Kerkhof, 1998; Stephen et al., 1999).

3.5. Composition of ammonia-oxidizing communities in various environmental sites

The *amoA*-based T-RFLP community fingerprint patterns suggested that *Nitrospira* spp. were the predominant subgroup of beta-proteobacterial ammonia oxidizers in the samples RR90 and OST. In these samples only the *Nitrospira*-specific 283-bp OTU was detected. *Nitrosomonas*-like organisms seemed to make a major contribution to the ammonia-oxidizing communities of the samples TUK and SP (219-bp OTU) (Table 1). In contrast, the freshwater lakes 'Plußsee' and 'Schöhsee' were characterized by the exclusive detection of ammonia oxidizers belonging to the correspondingly named lineages 'Plußsee' and 'Schöhsee'. The T-RFLP patterns also revealed clear differences in the composition of the ammonia oxidizers between the two

activated sludge samples examined. While the sewage plant ASK was mainly characterized by a defined subcluster of the 'Schöhsee' lineage (491-bp OTU), the main OTUs recovered from the sewage plant SP were indicative of *Nitrosomonas*-like and *Nitrospira*-like *amoA* sequence types.

4. Conclusions

This investigation showed that the T-RFLP technique represents a convenient and effective tool to detect *amoA* sequence types, which correspond to defined subgroups of the beta-proteobacterial ammonia oxidizers, in environmental PCR products. This cloning-independent technique may especially be applied as a rapid screening method for studies in which many environmental samples have to be monitored for differences in the composition of the ammonia-oxidizing communities.

Acknowledgements

We thank Sonja Fleissner for excellent technical assistance. We especially express our gratitude to Karl-Paul Witzel (Max-Planck-Institut für Limnologie, Plön, Germany) for providing biomass of the strains *Nitrosomonas halophila* Nm1, *Nitrosomonas nitrosa* Nm90, and *Nitrospira* sp. L13. We are also indebted to Peter Dunfield for critically reading the manuscript and to two anonymous reviewers for the constructive criticism of the manuscript. This work was supported by grants from the

Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (no. 0311121) and the European Community RTD Programme Biotechnology (no. BIO-CT96-0419).

References

- Bruce, D., 1997. Analysis of *mer* gene subclasses within bacterial communities in soils and sediments resolved by fluorescent-PCR-restriction fragment length polymorphism profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4914–4919.
- Chandler, D.P., Fredrickson, J.K., Brockman, F.J., 1997. Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries. *Mol. Ecol.* 6, 475–482.
- Ford, D.L., Churchwell, R.L., Kachtick, R.L., 1980. Comprehensive analysis of nitrification of chemical processing wastewaters. *J. Water Pollut. Control Fed.* 52, 2726–2745.
- Frenzel, P., Rothfuss, F., Conrad, R., 1992. Oxygen profiles and methane turnover in flooded rice microcosm. *Biol. Fertil. Soils* 14, 84–89.
- Hiorns, W.D., Hastings, R.C., Head, I.M., McCarthy, A.J., Saunders, J.R., Pickup, R.W., Hall, G.H., 1995. Amplification of 16S ribosomal RNA genes of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria demonstrates the ubiquity of nitrospiras in the environment. *Microbiology* 141, 2793–2800.
- Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K.-H., Pommerening-Röser, A., Koops, H.-P., Wagner, M., 1998. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3042–3051.
- Klotz, M.G., Alzerreca, J., Norton, J.M., 1997. A gene encoding a membrane protein exists upstream of the *amoA/amoB* genes in ammonia-oxidizing bacteria; a third member of the *amo* operon? *FEMS Microbiol. Lett.* 150, 65–73.
- Kowalchuk, G.A., Stephen, J.R., De Boer, W., Prosser, J.I., Embley, T.M., Woldendorp, J.W., 1997. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class *Proteobacteria* in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1489–1497.
- Kowalchuk, G.A., Naoumenko, Z.S., Derikx, P.J.L., Felske, A., Stephen, J.R., Arkhipchenko, I.A., 1999. Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class *Proteobacteria* in compost and composted materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 396–403.
- Liesack, W., Janssen, P.H., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L., Stackebrandt, E., 1997. Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. In: van Elsas, J.D., Trevors, J.T., Wellington, E.M. (Eds.), *Modern Soil Microbiology*, Marcel Dekker, New York, pp. 375–439.
- Liu, W.-T., Marsh, T.L., Cheng, H., Forney, L.J., 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4516–4522.
- Matulewich, V.A., Strom, P.F., Finstein, M.S., 1975. Length of incubation for enumerating nitrifying bacteria present in various environments. *Appl. Microbiol.* 29, 265–268.
- McTavish, H., Fuchs, J.A., Hooper, A.B., 1993. Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* 175, 2436–2444.
- Moyer, C.L., Dobbs, F.C., Karl, D.M., 1994. Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 871–879.
- Moyer, C.L., Dobbs, F.C., Karl, D.M., 1995. Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1555–1562.
- Rotthauwe, J.-H., Witzel, K.-P., Liesack, W., 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4704–4712.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- Sakano, Y., Kerkhof, L., 1998. Assessment of changes in microbial community structure during operation of an ammonia biofilter with molecular tools. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4877–4882.
- Stephen, J.R., McCaig, A.E., Smith, Z., Prosser, J.I., Embley, T.M., 1996. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4147–4154.
- Stephen, J.R., Chang, Y.J., Macnaughton, S.J., Kowalchuk, G.A., Leung, K.T., Flemming, C.A., White, D.C., 1999. Effect of toxic metals on indigenous soil β -subgroup proteobacterium ammonia oxidizer community structure and protection against toxicity by inoculated metal-resistant bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 95–101.
- Strunk, O., Ludwig, W., 1988. April 1988, revision date. [Online]. ARB: a software environment for sequence data. <http://www.biol.chemie.tu-muenchen.de/pub/ARB/Technische>, Universität, Munich, Germany.
- Von Wintzingerode, W., Göbel, U.B., Stackebrandt, E., 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 213–229.
- Voytek, M.A., Ward, B.B., 1995. Detection of ammonium-oxidizing bacteria of the beta-subclass of the class *Proteobacteria* in aquatic samples with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1444–1450.

Lebenslauf

Hans-Peter Horz, geboren am 16.05.1967 in Dernbach.

Schulausbildung

06.1986 Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung

08.1986 - 06.1988 Ausbildung zum Industriekaufmann
(Fa. Fuchs-Ton GmbH & Co. KG, Ransbach-Baumbach)

Sonstige Ausbildung

08.1986 - 08.1989 Ausbildung zum Betriebswirt (berufsbegleitend)
(VWA: Verwaltungs-und Wirtschaftsakademie Koblenz)

Berufliche Tätigkeit

07.1988 - 10.1989 Kaufmännischer Angestellter (Fa. Fuchs-Ton GmbH & Co. KG)
10.1989 - 12.1990 Zivildienst
01.1991 - 10.1992 Kaufmännischer Angestellter (Fa. Fuchs-Ton GmbH & Co. KG)

Studium

10.1992 - 12.1997 Studium an der Philipps-Universität Marburg
01.1997 - 12.1997 externe Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie,
Marburg, unter Anleitung von PD Dr. Werner Liesack. "Vergleichende
molekularbiologische Charakterisierung methanogener Populationen an
Wurzeln verschiedener Reisvarietäten".

12.1997 Diplom

seit 01.1998 Dissertation am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg
unter Anleitung von PD Dr. Werner Liesack

Dank

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Werner Liesack und Prof. Dr. Ralf Conrad für die Bereitstellung des Themas sowie für ihre ständige Diskussionsbereitschaft, die mir wertvolle Anregungen für die Gestaltung meiner Doktorarbeit lieferte.

Prof. Dr. W. Buckel danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich danke allen Mitarbeitern der Abteilung Biogeochemie für das tolle Arbeitsklima, den zahlreichen technischen Hilfestellungen und konstruktiven Ratschlägen. Thilo Henckel und Bianca Wagner danke ich dafür, daß sie mich in die hohe Kunst der DGGE-Technik einführten. Sonja Fleissner danke ich für die unentwegte Unterstützung im Laboralltag, insbesondere für die Herstellung lupenreiner Sequenzier- und GeneScan-Gele. Markus Drescher sei gedankt für technische Spezialdienste aller Art. Ich danke Merlin Tschawa Yimka für die Zusammenarbeit bei der Suche nach „neuen“ Methanotrophen.

Für die moralische Unterstützung während meiner Schreibphase (-und Blockade) im Computerraum danke ich Sharon Avrahami, Melanie Klose, Sabine Weber und Xiao Lei Wu.

Ein besonderes highlight im harten Forschungsalltag waren die vielschichtigen, meist um die Mittagszeit abgehaltenen „Seminare“, die für Entspannung und den nötigen „extra-terrestrischen“ Weitblick sorgten. Als Mitglieder dieser interdisziplinären Veranstaltung sind in alphabetischer Reihenfolge zu nennen: Kuk-Jeong Chin, Manigéé Derakshani, Jana Höppner, Daniel Scheid und Stephan Stubner. Als weitere ehemalige „Seminarteilnehmer“ dürfen nicht vergessen werden: Regine Großkopf-Lüdemann, Andreas Henckel, Heiner Lüdemann, Thomas Lukow, Ralf Oltmanns, und Dirk Rosencrantz. Ihnen allen gebührt ein besonderes Dankeschön für viele, schöne MPI-Zeiten, auch außerhalb des „Seminars“.

Ein weiterer Dank geht an die „AG Fußball“. Die durchgeführten ba(l)listischen Freiland-Experimente haben viel Spaß gemacht, wenngleich der eine oder andere Versuch nicht ganz ungefährlich war.

Noch ein herzliches Dankeschön an Manigéé und Regine für das sorgfältige Korrekturlesen und die vielen (wertvollen bis essentiellen) Verbesserungsvorschläge.

Am meisten danke ich jedoch Angela, die mir immer wieder gezeigt hat, daß es auch außerhalb der Wissenschaft noch ein Leben gibt.

Erklärung

Ich versichere, daß ich meine Dissertation

Entwicklung und Anwendung molekularer Techniken zur Charakterisierung
nitrifizierender und methanotropher Populationen in natürlichen Ökosystemen

selbständig verfaßt, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und
sämtliche Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen
sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe. Die Versicherung schließt
Zeichnungen und Skizzen mit ein.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner
anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken
gedient.